



Facultad de Ciencias

Departamento de Física Aplicada

***SENSORES MÁSICOS PARA LA
DETECCIÓN DE AGENTES DE GUERRA
QUÍMICA Y BIOLÓGICA***

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas

presentada por:

Daniel Matatagui Cruz

Realizada en el Grupo de Investigación y Desarrollo de Sensores (**GRIDSEN**) del
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (**CSIC**).

Directores de Tesis:

Dra. Maria del Carmen Horrillo Güemes

Dr. José Luis Fontecha González

- Madrid 2012 -

A mis padres y hermanos

***"Los que aseguran que es imposible no deberían
interrumpir a los que estamos intentándolo."***

Thomas Alva Edison

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es el resultado del esfuerzo de muchas personas, a las que muestro mi gratitud en estas líneas por hacerme sentir afortunado tanto en lo profesional como en lo personal.

Al escribir el punto final de este trabajo he sido consciente que hay dos personas que se han excedido en sus obligaciones para hacer posible este proyecto. Gracias a la Dra. M^a del Carmen Horrillo Güemes y al Dr. José Luis Fontecha González por sus conocimientos aportados, dedicación, apoyo, y una paciencia infinita con el autor.

Por tantos conocimientos, momentos divertidos y por hacerme sentir que el Laboratorio era mi primera casa, mis agradecimientos de forma muy especial a Manuel, Josepe, Isabel, Enrique, Alberto, Paqui, Jaime y Carlos. Casi con cuatro años de retraso, le doy las gracias a M^a Jesús Fernández, la persona que más horas ha compartido conmigo en el laboratorio y que entre otras muchas cosas me enseñó a utilizar la más rebelde de las microsoldadoras.

Gran parte de los resultados aquí obtenidos son consecuencia de la colaboración con diferentes grupos, por ello he reservado este momento para agradecer al Dr. Javier Gutierrez su colaboración para hacer posible mis estancias en el Universidad de Burdeos. En las cuales el Prof. Dominique Rebière y la Dra. Corinne Dejous me concedieron libertad para trastear en los laboratorios bajo su dirección, y me presentaron al hombre que abrió la ventana para mostrarme una pequeña porción del fascinante mundo de la inmunología, el Dr. Daniel Moynet. También agradezco a Maria Jesús Oliver y al Prof. Jose Luís Sánchez de Rojas de la Universidad de Castilla- La Mancha su colaboración para desarrollar el inmunosensor, que me ha permitido pasarme horas mirando un experimento mientras pensaba “vamos anticuerpos reaccionar con los antígenos”. Del mismo modo quiero agradecer a los participantes de los proyectos ISIS y NAMIRIS su aportación en este trabajo.

En lo personal, deseo dar las gracias a mis abuelos por la mejor herencia que un nieto puede recibir, que son mis padres. Agradezco inmensamente a mi madre que desde pequeño se sentase todos los días conmigo para hacer juntos los deberes, y a mi padre que nunca me dejase abandonar el camino que me ha traído hasta aquí. Pero también les

agradezco tanto a ellos como a mis hermanos que hayan dado la cara en cada momento difícil.

No me puedo olvidar de Irene, a quien he dejado plantada miles de veces para quedarme trabajando y sin embargo me ha preparado día tras día “tappers” con deliciosa comida verde.

Solo siento una patria, llamada Fuentes de Béjar, y no es por el hermoso paraje donde se sitúa, sino por tantos camaradas que me ha proporcionado dicho lugar. A todos y cada uno de ellos relacionados con este pueblo y alrededores, un especial agradecimiento por tantos momentos felices compartidos y por seguirme a tantos viajes para poder tomarnos unas cañas.

Finalmente, me gustaría terminar estas líneas recordando el primer día de clase en la universidad, cuando me acerqué a un chico con gafas, camisa, pantalones chinos y zapatos, pensando que era la persona idónea para que aprobase la carrera por mí. En parte acerté, ya que sin su ayuda y la de todos mis amigos de la universidad ahora no estaría escribiendo una tesis. Por ello, les doy las gracias por fotocopiarne tantos apuntes, permitirme robarles tantos conocimientos y compartir un montón de momentos amenos mientras preparábamos exámenes. Estas ayudas desinteresadas han sido tan importantes que fruto de ellas son las figuras 4.14 y 4.15, las cuales se las dedico a Cristina por todas esas veces que ha perdido el tiempo ayudándome con mi trabajo.

ÍNDICE

Capítulo 1

Introducción1

1.1. Introducción.....	1
1.2. Marco de trabajo.....	2
1.3. Objetivos de la tesis.....	2
1.4. Estructura de la tesis.....	3

Capítulo 2

Sistemas de detección para armas químicas y biológicas

2.1. Agentes de Guerra Química (CWA)	5
2.1.1. Características de un agente químico para ser utilizado como arma química	6
2.1.2. Diferentes tipos de agentes de guerra química	6
2.1.3. Principales agentes de guerra química.....	7
2.1.4. Diferentes métodos de dispersión de agentes químicos	8
2.1.5. Sistemas de detección de agentes químicos	8
2.1.5.1. Sistemas de detección de agentes de guerra química basados en técnicas convencionales de análisis.....	9
2.1.5.1.1. Espectroscopía de Movilidad Iónica (IMS).....	9
2.1.5.1.2. Fotometría de emisión de llama (FPD).....	11
2.1.5.1.3. Espectroscopía de infrarrojos	12
2.1.5.1.4. Espectroscopía Raman.....	14
2.1.5.1.5. Colorimetría.....	15
2.1.5.1.6. Foto-ionización (PID).....	16
2.1.5.2. Sistemas de detección basados en sensores de estado sólido	17
2.1.5.2.1. Sensores másicos	18
2.1.5.2.2. Sensores resistivos de óxidos metálicos	19
2.2. Agentes de Guerra Biológica (BWA).....	21

2.2.1. Características de un agente biológico para ser utilizado como arma biológica	21
2.2.2. Diferentes tipos de agentes biológicos	22
2.2.3. Principales agentes de guerra biológica.....	23
2.2.4. Diferentes métodos de dispersión de agentes biológicos	23
2.2.5. Vía infecciosa de los agentes biológicos	24
2.2.6. Sistemas de detección de agentes biológicos	24
2.2.7. Biosensores como identificadores	25
2.2.7.1. Sensores biocatalíticos.....	26
2.2.7.2. Sensores de bioafinidad o inmunosensores	27
2.2.7.3. Biosensores electroquímicos	28
2.2.7.3.1. Amperimétricos	29
2.2.7.3.2. Potenciométricos	29
2.2.7.3.3. Conductimétricos e impedimétricos	29
2.2.7.3.4. Transistores de efecto de campo.....	30
2.2.7.4. Biosensores ópticos	31
2.2.7.4.1. Optrodos	31
2.2.7.4.2. Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)	32
2.2.7.4.3. Guías de onda plana.....	32
2.2.7.4.4. Interferómetros Mach-Zehnder.....	33
2.2.7.4.5. Elipsometría.....	34
2.2.7.5. Biosensores másicos	34
2.2.7.6. Biosensores termométricos.....	35
2.2.7.7. Biosensores magnéticos.....	36
2.3. Referencias	36

Capítulo 3

Fundamento teórico de los sensores másicos basados en ondas acústicas

3.1. Introducción.....	43
3.2. Generación de ondas acústicas en sustratos piezoeléctricos	44
3.2.1 Efecto piezoeléctrico	44
3.2.2. Propagación de ondas acústicas.....	46
3.2.3. Perturbaciones en la propagación de ondas acústicas	47
3.3. Dispositivos basados en ondas acústicas	48
3.3.1. Ondas de volumen (Bulk Acoustic Wave, BAW).....	49

3.3.2. Ondas SAW y APM	50
3.3.3. Ondas de Rayleigh.....	52
3.3.4. Ondas Horizontales Transversales SAW (SH-SAW).....	53
3.3.5. Ondas Love.....	54
3.3.6. Ondas Horizontales Transversales - APM (Acoustic Plate Mode)	63
3.3.7. Ondas Lamb (Flexural Plate).....	64
3.4. Conclusiones.....	66
3.5. Referencias	66

Capítulo 4

Desarrollo de dispositivos másicos. Sistemas experimentales de medida y métodos de tratamiento de datos

4.1. Generalidades de los dispositivos desarrollados	71
4.2. Instrumentación para caracterizar los sensores	74
4.3. Dispositivos másicos para la detección de compuestos volátiles	75
4.3.1. Dispositivos másicos basados en ondas Rayleigh (RSAW).....	76
4.3.2. Dispositivos másicos basados en ondas Love	78
4.3.2.1. Dispositivos con capa guía de SiO ₂	79
4.3.2.1.1. Depósito de SiO ₂	79
4.3.2.1.2. Cálculo del espesor óptimo de la capa guía de SiO ₂	79
4.3.2.1.3. Diseño de los dispositivos con capa guía de SiO ₂	82
4.3.2.2. Dispositivos con capa guía de Novolac.....	95
4.3.2.2.1. Calculo del espesor óptimo de la capa guía de Novolac	95
4.3.2.2.2. Depósito de Novolac	96
4.3.3. Sistema oscilador de los dispositivos SAW	101
4.3.4. Cámara de medida con array de dispositivos	103
4.3.5. Sistema de extracción de volátiles: Espacio de cabeza	104
4.3.6. Montaje experimental para la caracterización con compuestos volátiles... 106	
4.3.7. Métodos de reconocimiento de patrones	108
4.3.7.1. Reducción de variables: Análisis de componentes principales	108
4.3.7.2. Clasificación: Redes neuronales	110
4.4. Dispositivo Love para líquidos.....	116
4.4.1. Características físicas de los bioagentes.....	118
4.4.2. Microfluídica	118
4.4.3. Chip de PDMS para la formación de microcanales.....	120

4.4.4. Control de temperatura del sistema	124
4.4.5. Otros componentes de la celda de líquidos.	125
4.4.6. Montaje experimental para la caracterización de bioagentes	126
4.5. Conclusiones.....	128
4.6. Referencias	129

Capítulo 5

Detección de simulantes de agentes de guerra química

5.1. Introducción	135
5.2. Simulantes de agentes de guerra química.....	135
5.3. Polímeros como materiales sensibles	137
5.3.1. Técnicas de depósito de capas sensibles.....	137
5.3.1.1. Depósito de polímeros por spray	138
5.3.1.2. Depósito de polímeros por “spinning”	139
5.3.2. Comparación entre dispositivos con respecto a la sensibilidad másica.....	140
5.4. Arrays de sensores másicos	145
5.4.1. Array 1 de sensores RSAW - Basado en bibliografía	145
5.4.2. Array 2 de sensores RSAW - Basado en la aplicación de la ecuación LSER	150
5.4.3. Array 3 de sensores Love (Cuarzo/SiO ₂) – Basado en la ecuación LSER.	158
5.4.4. Array 4 de sensores Love (Cuarzo/Novolac) – Basado en la ecuación LSER	161
5.5. Comparación de la respuesta de los sensores SAW mediante la exposición a un simulante de CWA	165
5.6. Conclusiones.....	166
5.7. Referencias	167

Capítulo 6

Detección de simulantes de agentes de guerra biológica

6.1. Introducción.....	169
6.2. Puesta a punto del sistema experimental para líquidos	169
6.3. Inmunosensor basado en dispositivos de ondas Love	171
6.3.1. Protocolo de funcionalización de la superficie de la capa guía del dispositivo Love (SiO ₂).....	172
6.3.2. Elemento de reconocimiento - Anticuerpo	173
6.3.3. Detección de inmunoglobulina de conejo	174

6.3.3.1. Protocolo de medida	174
6.3.3.2. Resultados de la inmunorreacción	177
6.3.3.3. Novedades del sistema presentado comparado con los de una microbalanza de cuarzo (QCM) trabajando en modo estático.	178
6.3.3.4. Utilización de un anticuerpo conjugado con nanopartículas de oro para la inmunodetección.....	180
6.3.4. Detección del virus M13	185
6.3.4.1. Contabilización de fagos por la técnica de doble placa de agar (DLA) ..	186
6.3.4.2. Protocolo de detección del fago.....	187
6.3.4.3. Resultados de la inmunoreacción	189
6.3.4.4. Detección del fago mediante el AM13 como anticuerpo secundario.....	193
6.3.4.5 Contabilización de los virus fijados a la superficie del sensor	195
6.4. Conclusiones.....	196
6.5. Referencias	197

Capítulo 7

Conclusiones de la investigación y líneas futuras

7.1. Conclusiones de la investigación.....	199
7.2. Líneas futuras de la investigación	202

Anexo 1

Agentes de guerra biológica.....	205
---	------------

Anexo 2

Constantes características del cuarzo	211
--	------------

Publicaciones

Publicaciones en revistas (SCI)	213
Publicaciones en revistas (no SCI)	213
Publicaciones en congresos internacionales	213
Publicaciones en congresos nacionales	214

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

Los agentes de guerra química y biológica se caracterizan por los efectos que tienen sobre la salud humana, muchos de ellos son mortales cuando se suministran en bajas concentraciones. Una de las principales preocupaciones en seguridad apunta hacia la utilización de estos agentes en lugares públicos para atentar contra la población civil.

Existen diversos sistemas para su detección, pero su uso se ve limitado por varios factores, los más destacados son: la muestra requiere una elaborada preparación, van acompañados de una compleja instrumentación que además suele tener un coste desorbitado, su operación y análisis implica personal técnicamente entrenado y en muchos de los casos los sistemas no son portátiles.

Los sensores de ondas acústicas superficiales (SAW) tienen muy alta sensibilidad y bajo coste, dimensiones pequeñas y la posibilidad de integrarlos en sistemas portátiles o inalámbricos. Por las anteriores ventajas se proponen como alternativa a los sistemas convencionales de detección de agentes de guerra química y biológica.

Los dispositivos SAW (Rayleigh y Love) se pueden funcionalizar con diversidad de materiales que adsorben los volátiles y ello permite la formación de arrays para la detección, su discriminación y clasificación mediante técnicas de reconocimiento de patrones. Pero además en muchos materiales la adsorción de volátiles es reversible y por tanto los sistemas pueden ser reutilizados tantas veces como sea necesario.

Dentro de los dispositivos SAW, hay dispositivos que además de trabajar en fase gaseosa también pueden hacerlo en fase líquida, como es el caso de los sensores

basados en la propagación de ondas Love. Esto permite desarrollar inmunosensores de muy bajo coste para la detección de agentes de guerra biológica. La incorporación de estructuras microfluídicas en el sistema de detección puede aportar grandes ventajas, como por ejemplo que solo requieren unos pocos microlitros de la muestra que se desea analizar.

1.2. Marco de trabajo

Este trabajo se ha desarrollado en el seno de diferentes proyectos nacionales enfocados a la puesta a punto de materiales, dispositivos y micro-nanotecnologías para la fabricación e integración de sistemas de detección de contaminantes en fase líquida y gaseosa para aplicaciones de seguridad. Estos proyectos han sido: “Integración de sistemas inteligentes para Seguridad (ISIS)” (TEC2007-67962-C04-02) y “Sistema modular basado en micro-nanotecnologías avanzadas para aplicaciones de seguridad y calidad ambiental (NAMIRIS)” (TEC2010-21357-C05-04).

1.3. Objetivos de la tesis

Los objetivos propuestos al comienzo de este trabajo han sido:

- Desarrollar y optimizar sensores, de muy alta sensibilidad, basados en ondas acústicas superficiales (SAW) sobre cuarzo. Caracterizar estos dispositivos mediante su respuesta en frecuencia.
- Evaluar los agentes de guerra química (CWA) y biológica (BWA) más representativos en el campo de la seguridad. Determinar los simulantes de cada uno de ellos, que servirán para testar los sistemas de detección.
- Emplear tanto los dispositivos basados en ondas Rayleigh como los basados en ondas Love para la detección de simulantes de agentes de guerra química (CWA).
- Seleccionar los polímeros óptimos que actúan como capas sensibles para poder detectar, discriminar y clasificar cada simulante de agente de guerra química. Utilizar y comparar diferentes métodos de depósito para dichos polímeros.
- Diseñar y poner a punto el montaje experimental para validar los sistemas de detección con los simulantes de CWA.

- Desarrollar inmunosensores basados en dispositivos de onda Love, con el fin de detectar agentes de guerra biológica (BWA) en fase líquida.
- Incorporar al sistema de detección de BWA tecnología microfluídica para que sea posible trabajar con pequeños volúmenes de muestras.
- Diseñar el protocolo de funcionalización de los dispositivos para la fijación del material biológico de reconocimiento. Elección del material biológico de reconocimiento y del protocolo de medida.

1.4. Estructura de la tesis

Al principio del trabajo, en el capítulo 2, se presentan los principales agentes de guerra química y biológica y se revisan los sistemas de detección e identificación establecidos.

Un detallado fundamento teórico de los dispositivos másicos de ondas acústicas se desarrolla en el capítulo 3, debido a que esta investigación se basa en este tipo de dispositivos.

En el capítulo 4 el fundamento teórico se toma como herramienta para el desarrollo de dispositivos de ondas acústicas superficiales (Rayleigh y Love). En este capítulo también encontramos la integración de estos dispositivos en los sistemas de detección tanto para fase gaseosa como líquida. Por último se detallan los montajes experimentales realizados para la detección de los agentes de guerra química y biológica.

Los arrays formados tanto con sensores basados en ondas Rayleigh como en ondas Love, se han validado mediante simulantes de agentes de guerra química y los resultados se presentan en el capítulo 5.

Los biosensores desarrollados con dispositivos Love se han validado con dos inmunorreacciones, que han servido para detectar el antígeno que simula al bioagente. Los resultados se muestran en el capítulo 6.

Finalmente, en el capítulo 7, se presentan las conclusiones obtenidas de los resultados de esta investigación y las líneas futuras de trabajo.

CAPÍTULO 2

SISTEMAS DE DETECCIÓN PARA ARMAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

2.1. Agentes de Guerra Química (CWA)

El uso a gran escala de agentes nocivos como armas químicas fue posible durante la Primera Guerra Mundial (1914-1918) debido al crecimiento de la industria. Se estima que fueron lanzadas sobre el campo de batalla más de 110.000 toneladas. En la actualidad muchos de estos agentes químicos han pasado a ser fabricados por agrupaciones o incluso de forma individual con el fin de atentar contra civiles, siendo una amenaza en todos los países industrializados, ya que estos se fabrican a partir de productos químicos de uso común en la industria. Debido a este importante problema es necesario desarrollar sistemas de detección rápidos, de bajo coste, de fácil operación y alta sensibilidad.

La **Convención para la Prohibición de las Armas Químicas** tiene el objetivo de eliminar todo tipo de armas químicas. En España se ratificó el 3 de agosto de 1994 y de su aplicación se encarga la Autoridad Nacional para la Prohibición de las Armas Químicas. En dicha Convención se definieron los siguientes términos:

- **Sustancia química tóxica:** Toda sustancia que, por su acción química sobre los procesos vitales, pueda causar la muerte, la incapacidad temporal o lesiones permanentes a seres humanos o animales. Quedan incluidas todas las sustancias químicas de esa clase, cualquiera que sea su origen o método de producción, ya sea que se produzcan en instalaciones, como municiones o de otro modo.

- **Arma química:**

- a) Las sustancias químicas tóxicas o sus precursores, salvo cuando se destinen a fines no prohibidos por la presente Convención, siempre que los tipos y cantidades de que se trate sean compatibles con esos fines.
- b) Las municiones o dispositivos destinados de modo expreso a causar la muerte o lesiones mediante las propiedades tóxicas de las sustancias especificadas en el apartado a) que libere el empleo de esas municiones o dispositivos.
- c) Cualquier equipo destinado de modo expreso a ser utilizado directamente en relación con el empleo de las municiones o dispositivos especificados en el apartado b).

2.1.1. Características de un agente químico para ser utilizado como arma química

Para que un agente químico sea utilizado como armamento, principalmente ha de ser altamente tóxico, además de tener características que permitan manipularle, poderse almacenar por largos períodos de tiempo en recipientes adecuados sin que el material de envoltura sea corroído, resistir a la humedad atmosférica, al oxígeno y al calor, para no perder efectividad al ser dispersado, y poder ser empleado con munición de artillería.

2.1.2. Diferentes tipos de agentes de guerra química

- **Agentes nerviosos:** compuestos orgánicos químicos que contienen ácido fosfórico (organofosfatos), capaces de colapsar el mecanismo mediante el cual el sistema nervioso envía mensajes a los órganos del cuerpo. Este colapso está causado por el bloqueo de la enzima acetilcolinesterasa, que normalmente disminuye la actividad de un neurotransmisor denominado acetilcolina. Al bloquearse dicha enzima aumenta de manera descontrolada la actividad de la acetilcolina, lo cual origina espasmos musculares e interrumpe funciones orgánicas vitales causando finalmente la muerte. De todos los agentes de guerra química estos suelen ser los más mortíferos.
- **Agentes vesicantes:** sustancias que pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas y que en contacto con la piel producen irritación y ampollas. Su acción va desde la irritación leve de la piel a la ulceración y fuertes quemaduras, llegando a

producir la destrucción de los tejidos. Los ojos son una zona especialmente sensible a ellas. También, en el caso de ser ingeridas o aspiradas, pueden producir un efecto asfixiante por su acción vesicante en la tráquea y los bronquios. Estos agentes suelen incapacitar a las víctimas y afectar a su salud durante un largo periodo.

- **Agentes sanguíneos:** agentes que se distribuyen a lo largo del cuerpo a través del sistema sanguíneo, aunque no suelen afectar a este directamente. Interfieren bien en la respiración, bajando el nivel de oxígeno retenido del aire inspirado, o bien en la respiración celular provocando hipoxia tisular (privación del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre la sangre y los tejidos). Algunos síntomas son estrés respiratorio, cefalea, insensibilidad, convulsiones o coma.
- **Agentes pulmonares o asfixiantes:** compuestos que actúan sobre el ejercicio normal de la función respiratoria por su capacidad de impedir o dificultar el transporte de oxígeno. Funcionan causando una acumulación de líquidos en los pulmones provocando sofocación. Suelen ser corrosivos en contacto con ojos y piel, causando la visión velada y quemaduras profundas severas. La inhalación de estos agentes causa quemaduras en la garganta, tos, vómitos, dolor de garganta, dolor en pecho, tirantez en pecho, y puede conducir a la insuficiencia respiratoria y circulatoria.
- **Agentes incapacitantes:** agentes que producen efectos fisiológicos o mentales temporales, o ambas cosas, y que pueden inhabilitar a las personas para trabajar en el desempeño de sus funciones.
- **Agentes lacrimógenos:** compuestos químicos que actúan sobre los nervios córneos, en los ojos o las mucosas. Estos provocan irritación en los ojos, la nariz, la boca y los pulmones y causan dolor, ceguera temporal, estornudos, tos, etc.

2.1.3. Principales agentes de guerra química

Para determinar la letalidad de los agentes de guerra química (CWA) se utiliza como referencia la dosis letal media (median lethal dose, LD₅₀) que se refiere a la dosis necesaria para que la mitad de la población expuesta a estos agentes muera. También se

puede expresar esta dosis sobre el tiempo de exposición, en este caso se denomina LCt_{50} [1]. En la Tabla 2.1 aparece un ejemplo de los principales agentes de guerra química.

Tabla 2.1. Clasificación de los principales CWA y su toxicidad

Clase de Agente	Agente	Abreviatura	LCt_{50} ($mg \cdot min/m^3$)
Nerviosos	Sarín	GB	50 - 100
	O-etil 2-diisopropil amino etil metilfosfonotiolato	VX	100
	Somán	GD	70
	Tabun	GA	400
Vesicantes	Gas mostaza	HD	500 - 1500
	Mostaza nitrogenada	HN	1000 - 3000
	Lewisite	L	1400
Sanguíneos	Cianuro de hidrógeno	AC	2000 - 4500
	Arsina	SA	5000
	Cloruro de cianógeno	CK	11000
Pulmonares	Fosgeno	CG	1800 - 3200
	Difosgeno	DP	1600
	Cloropicrín	PS	20000

2.1.4. Diferentes métodos de dispersión de agentes químicos

Para que tengan efectos a gran escala los agentes químicos se dispersan en forma de aerosol (suspensión de partículas ultramicroscópicas de sólidos o líquidos en el aire u otro gas), nube de vapor, gotas líquidas o partículas solidas que puedan inhalarse. Las anteriores formas de dispersión se suelen conseguir mediante exposición de los agentes volátiles al viento, o bien esparciéndolos mediante granadas, proyectiles con fragmentación, bombardeo aéreo o pulverización desde aviones. Además estos agentes, en ocasiones, pueden ser dispersados en áreas reducidas a través de conductos de ventilación, en forma de spray o dejando que se evaporen.

2.1.5. Sistemas de detección de agentes químicos

El sistema ideal de detección de agentes de guerra química debería detectar la presencia e identificar a gran velocidad el agente, de esta forma el usuario dispone del tiempo necesario para proteger al personal antes de ser afectados por el agente.

Algunas consideraciones a tener en cuenta cuando se desarrollan sistemas para detectar este tipo de agentes son:

- **Selectividad:** capacidad del sistema para discriminar un agente entre varios objetivos de interés.
- **Sensibilidad:** viene determinada por la concentración más baja, o bien la mínima diferencia entre concentraciones, que puede ser detectada con certidumbre. Así un detector sensible es aquel que cambia ampliamente su señal, debido a diferencias pequeñas de las concentraciones del agente.
- **Tiempo de respuesta:** Es el tiempo que necesita el dispositivo para determinar a través de una señal fiable si un agente está presente. En el caso de agentes de guerra química se toma como referencia el LCt_{50} , para determinar si es corto o largo.
- **Tiempo de recuperación:** Es el tiempo que necesita el dispositivo para volver al estado en el que se encontraba antes de la detección del agente.
- **Repetitividad:** Es la capacidad que tiene un sistema para dar respuestas iguales ante la misma concentración de un agente dado y bajo las mismas condiciones.
- **Reproducibilidad:** Es el caso en el que las réplicas de los sistemas tienen respuestas similares.
- **Falso positivo:** cuando el sistema responde pero en realidad no hay el agente detectado.
- **Falso negativo:** en este caso el agente está presente pero no es detectado.

2.1.5.1. Sistemas de detección de agentes de guerra química basados en técnicas convencionales de análisis

Se presentan a continuación algunos de los sistemas de detección de agentes de guerra química basados en técnicas convencionales de análisis.

2.1.5.1.1. Espectroscopía de Movilidad Iónica (IMS)

Este dispositivo es comúnmente utilizado en el ámbito militar para detectar agentes químicos [1,2] y explosivos. Como sistema de detección se ha introducido en aeropuertos para la detección de agentes químicos, explosivos o drogas. En la actualidad es una herramienta experimental para el análisis de material biológico [1,3,4].

El IMS es un detector basado en la separación de analitos, ionizándolos mediante una fuente de radiación beta (ionización débil) y acelerándolos a través de un tubo de empuje, de este modo son separados según su masa, carga y movilidad en la fase

gaseosa [4,5]. Con la ayuda de un obturador en un extremo del tubo de empuje, y un detector en el extremo opuesto, se mide el tiempo de vuelo de cada analito (Fig. 2.1).

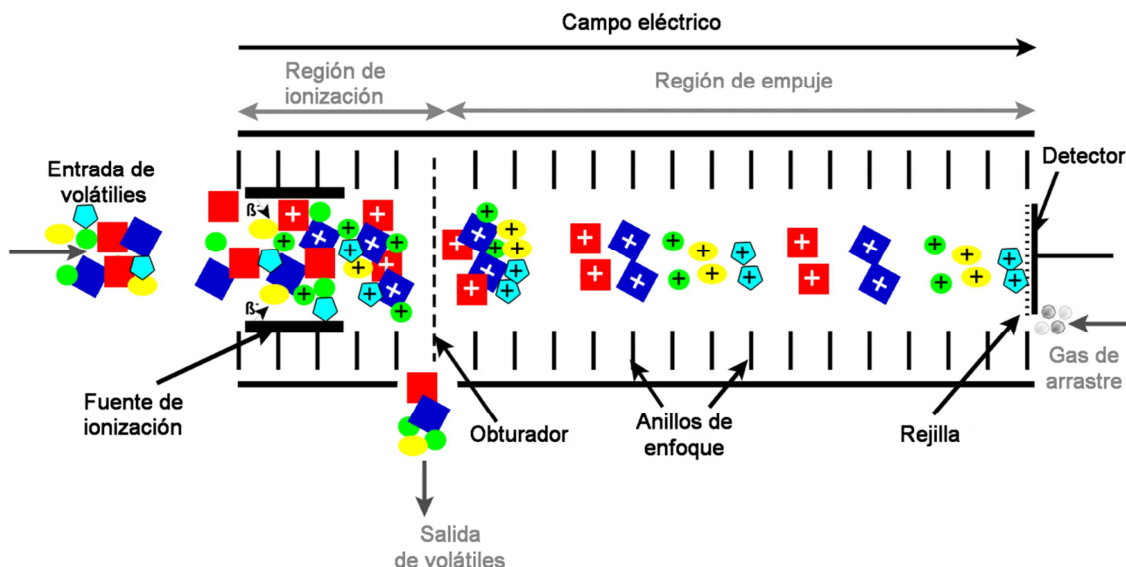


Figura 2.1. Esquema de un IMS separando iones dependiendo de sus masas y cargas.

Ventajas:

- La principal ventaja de este sistema es su simplicidad y sensibilidad [6].
- Tienen un corto tiempo de respuesta (unos pocos segundos).
- Capacidad para detectar bajas concentraciones (partes por millón, ppm o incluso partes por billón, ppb)
- Bajos costes de fabricación
- Se puede utilizar en atmósferas explosivas.
- Este sistema no requiere fuentes de alimentación especial, debido a que utiliza una fuente de ionización radioactiva.

Desventajas

- Los equipos portátiles tienen menos sensibilidad que los emplazados.
- Además son propensos a sufrir interferencias con los compuestos que no son de interés y producir falsas alarmas.
- Una alta concentración del agente puede saturar el detector.
- Temperatura, presión y humedad pueden tener efectos significativos en el dispositivo.

- Si diferentes agentes son introducidos en el IMS pueden dar lugar a espectros de difícil análisis.
- Para un óptimo funcionamiento el dispositivo debe operar con aire limpio, por esta razón en la entrada de la muestra se disponen unas membranas con baja permeabilidad (filtros) para moléculas de agua y polvo, evitando que estas pasen al sistema. Como consecuencia de estas membranas la sensibilidad disminuye y el tiempo de respuesta aumenta.

2.1.5.1.2. Fotometría de emisión de llama (FPD)

El fotómetro de llama ha sido un sistema de detección de agentes químicos utilizado exitosamente durante años y en muchos casos está integrado con un cromatógrafo de gases (GC-FPD) [1,7,8]. La fotometría de llama es una técnica de espectroscopía atómica, basada en la excitación de la muestra mediante una llama de hidrógeno y posteriormente cuando los átomos (generalmente de metales) pasan a estados energéticos más bajos emiten un fotón con una longitud de onda específica que depende de la energía entre estados. Así cada compuesto produce una emisión característica (Fig. 2.2) que puede estar constituida por una o varias longitudes de ondas, debido a las emisiones correspondientes a los diferentes átomos que la forman [9,10].

Un ejemplo para el cual este sistema es especialmente útil es la detección de agentes organofosforados y organosulfurados. Estos compuestos emiten en 526 nm y 394 nm respectivamente debido a la presencia de fósforo y azufre.

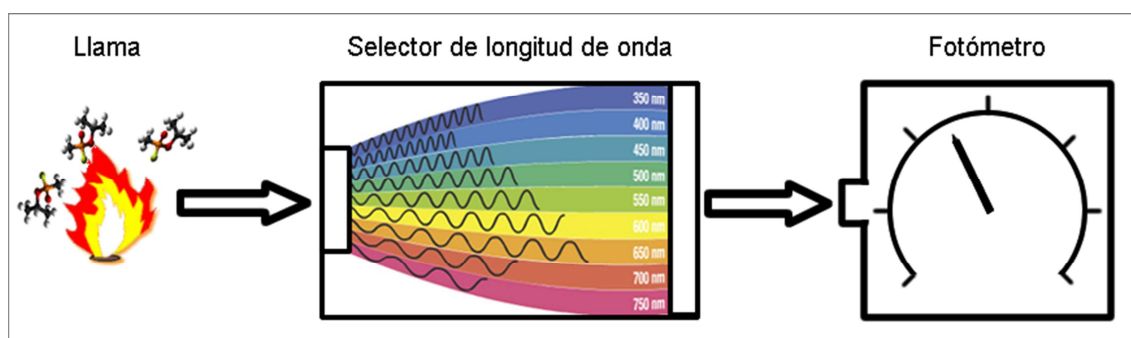


Figura 2.2. Esquema de un fotómetro de emisión de llama.

Ventajas:

- La concentración de compuestos organofosforados y organosulfurados en el ambiente suele ser muy baja, esto evita falsas alarmas de forma constante.

- Detecta en tiempo real.
- La llama descompone la muestra, y por tanto no crea residuos y no tiene efecto memoria.
- La llama de hidrógeno emite en UV y por tanto no interfiere con los elementos organofosforados y organosulfurados, y además estos elementos pueden ser detectados simultáneamente debido a las diferentes longitudes de onda de las radiaciones que emiten.
- No requiere que la muestra sea preparada.
- Corto tiempo de acondicionamiento para usarlo.

Desventajas:

- Solo detecta agentes químicos fosforados o sulfurados y no el resto de CWAs.
- No identifica el blanco, solo indica si contiene fósforo o azufre.
- La anterior desventaja, junto con su gran sensibilidad hace que se produzcan falsos positivos. Por esta razón suele utilizarse con un cromatógrafo de gases, permitiendo identificar y reducir las falsas alarmas.

2.1.5.1.3. Espectroscopía de infrarrojos

Una radiación de infrarrojo atraviesa la muestra haciendo vibrar las moléculas (Fig. 2.3), siendo parte de esta radiación absorbida y parte transmitida. El resultado es un espectro que representa la absorción o la transmisión molecular, creando una huella molecular de cada agente químico.

Su rango de medida en el espectro electromagnético abarca desde $0.78\ \mu\text{m}$ a $1000\ \mu\text{m}$. La luz absorbida para una longitud de onda es característica para cada grupo químico, como puede ser el enlace entre fósforo y oxígeno de los agentes nerviosos, y la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración del agente [11,12]. Por ejemplo la longitud de onda para el GA, GB y HD han sido determinadas como $9.7\ \mu\text{m}$, $9.9\ \mu\text{m}$ y $13.9\ \mu\text{m}$ respectivamente.



Figura 2.3. Diferentes modos de vibración de las moléculas

Ventajas:

- Rápida detección.
- No requiere preparación antes de la medida.
- Al ser una técnica no destructiva, permite medir la muestra con varias longitudes de onda aunque inicialmente haya producido una alarma. Debido a que un interferente puede responder a la misma longitud de onda que el agente, un conjunto de éstas son necesarias para confirmar la presencia del agente y evitar falsos positivos.
- No requiere calibración.

Desventajas:

- Equipos de alto coste.
- Complejidad de los diferentes sistemas.
- Dificultad para reducir el tamaño de la instrumentación.
- Efectos no deseados de las condiciones ambientales, pudiendo enmascarar picos de absorción de la muestra.
- Los detectores IR testados no tienen la suficiente sensibilidad para detectar CWAs por debajo del LCt₅₀.

2.1.5.1.4. Espectroscopía Raman

Esta técnica es muy útil por su rápida detección de agentes químicos y explosivos. En la espectroscopía Raman la muestra se ilumina con una luz monocromática procedente de un láser y la luz dispersada se detecta a otras longitudes de onda. La luz dispersada es resultado de las colisiones de los fotones con las moléculas de la muestra y estas pueden ser elásticas, denominándose dispersión Rayleigh, o inelásticas denominándose dispersión Raman. En la dispersiones Rayleigh y Raman, el fotón excita un electrón hasta un nivel de energía superior, seguidamente este decae a un nivel inferior emitiendo el fotón dispersado. La diferencia consiste en que en el caso Rayleigh el electrón decae al mismo nivel en el que se encontraba inicialmente, y en el caso Raman el electrón decae a un nivel diferente. Además dos diferentes procesos pueden suceder en este último caso: que el electrón caiga a un nivel superior al que se encontraba inicialmente o que pase a un nivel aún mas bajo, estos procesos son conocidos como dispersión Stokes Raman y Anti-Stokes Raman respectivamente. La espectroscopía más común es la Stokes Raman y la diferencia entre la longitud de onda de la radiación incidente y la dispersada, comúnmente conocida como desplazamiento Raman, corresponde al infrarrojo medio (Fig. 2.4). Así cada CWA con dispersión Raman es caracterizado por una huella espectral [13,14].

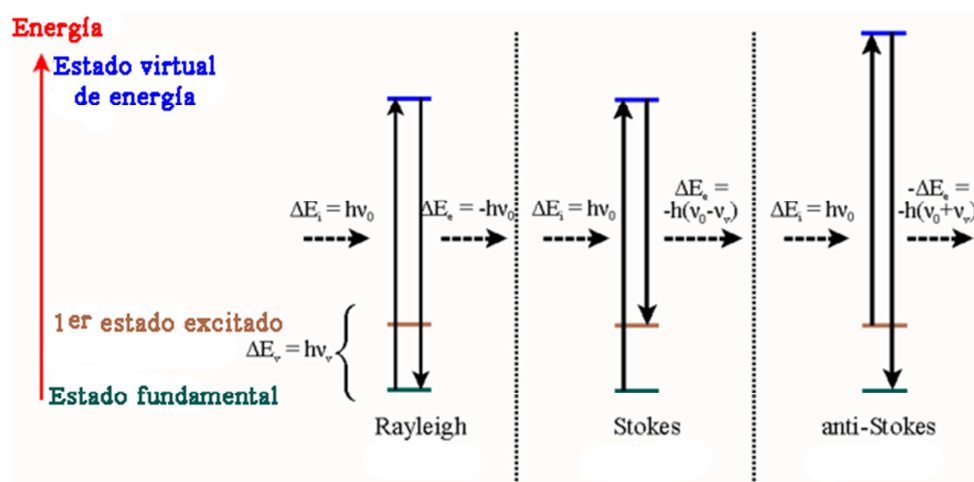


Figura 2.4. Diferentes modos de dispersión de un electrón.

Ventajas:

- La espectroscopía Raman es una técnica no destructiva que se puede utilizar con la muestra embebida en un cristal o contenedor, evitando así una peligrosa exposición.
- Puede medir gases, líquidos, aerosoles y sólidos.
- El agua no afecta en su forma líquida o gaseosa.
- Tiene alta especificidad.
- Las bandas Raman no tienen solapamiento.
- No es necesario un contacto directo con la muestra.
- El espectro se adquiere rápidamente.

Desventajas:

- La espectroscopía Raman no es 100% precisa, y produce falsos negativos.
- No puede detectar mezclas, porque muestras en pequeñas proporciones son enmascaradas.

2.1.5.1.5. Colorimetría

Es una técnica de química húmeda que detecta los CWAs debido al cambio de color como consecuencia de una reacción química producida cuando el agente entra en contacto con una determinada solución o sustrato [15,16]. Los detectores mas comunes están en forma de tubos o papeles (Fig. 2.5), estos últimos suelen ser sustratos impregnados con la solución química. La concentración suele venir determinada por la intensidad del color a un cierto tiempo de exposición.



Figura 2.5. Indicador colorimétrico.

Ventajas:

- En general estos sistemas son muy fáciles de usar.
- Muy bajo coste.
- Y una rápida respuesta en líquido, aunque lenta en concentraciones bajas de vapor.
- Muy pocas falsas alarmas ya que están diseñados para que solo reaccionen con una especie de compuesto químico, teniendo una gran selectividad.

Desventajas:

- La selectividad también se muestra como una desventaja, debido a la necesidad de disponer de tantos detectores como sustancias se quieran detectar.
- Cada persona tiene una percepción diferente de los colores.
- Pueden dejar de funcionar si pierde o absorbe humedad mientras está almacenado.

2.1.5.1.6. Foto-ionización (PID)

Funciona con iluminación ultravioleta (UV), y tiene la capacidad de detectar todos los compuestos volátiles que tengan una energía de ionización por debajo de la radiación UV. Esta técnica de detección se utiliza comúnmente por un GC. El dispositivo se compone de una cámara en “vacío” que se ilumina con radiación UV y en la que se encuentran dos electrodos metálicos entre los cuales existe una diferencia de potencial. La muestra queda ionizada con carga positiva debido a la pérdida de electrones como consecuencia de la incidencia de los fotones (Fig. 2.6). Entonces la muestra ionizada es atraída por el electrodo con carga negativa donde se neutraliza, siendo la corriente proporcional a la concentración [10]. Sólo los compuestos cuya energía de ionización es inferior a la energía de los fotones que emite la lámpara UV son ionizados por ella. Los compuestos del aire tienen energías de ionización superiores a la de los fotones UV de la lámpara, por esto no se ionizan y por tanto no contribuyen a la corriente, de esta forma no interfieren en la detección.

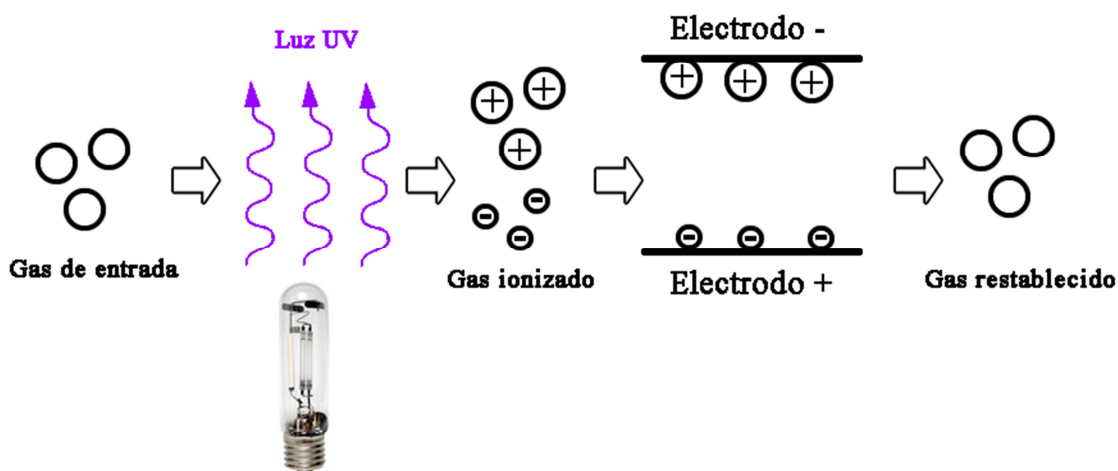


Figura 2.6. Esquema del proceso de ionización.

Ventajas:

- Muy alta sensibilidad y muy bajo límite de detección.
- Es capaz de medir la concentración del compuesto detectado.

Desventajas:

- Tiene una especificidad muy limitada, y da falsos positivos en ambientes desconocidos o en presencia de mezclas.
- Por tanto requiere un método adicional para separar muestras antes de entrar en el detector, por esto es usado habitualmente con un GC.

2.1.5.2. Sistemas de detección basados en sensores de estado sólido

Debido al creciente número de ataques a la población civil con agentes de guerra química, como los conocidos casos de los atentados con gas sarín en el metro de Japón por parte del grupo Aum Shinrikyo, existe una demanda de sistemas que puedan monitorizar la presencia de CWA in-situ, en tiempo real, con bajo consumo, alta sensibilidad y además que puedan ser portátiles.

Para la discriminación de volátiles con sensores microcantilevers y resistivos, es necesario el uso de matrices de sensores comúnmente denominado “array”, es decir, un conjunto de dispositivos con diferentes materiales sensibles, de forma que cada

elemento responderá de manera diferente a cada volátil, y la información dada por el conjunto será exclusiva para cada volátil.

A continuación se presentan los diferentes sensores en los que se centran los estudios más recientes, para satisfacer dicha demanda.

2.1.5.2.1. Sensores másicos

Son dispositivos que detectan cambios de masa producido por los volátiles. Con la finalidad de promover el cambio de masa es necesaria una capa sensible que adsorba los volátiles. Los más comunes son:

- **Microcantilevers** [17,18,19] o microvigas: se fabrican mediante microtecnología, normalmente a partir de silicio o nitruro de silicio (Fig. 2.7). Usualmente se pueden utilizar en dos diferentes modos de operación, el más simple se basa en medir la deflexión del cantiléver debido al cambio de masa que se produce en la superficie del mismo. El otro método de funcionamiento es hacerlo oscilar para determinar su frecuencia de resonancia y medir el cambio de esta frecuencia debido a la variación de masa.

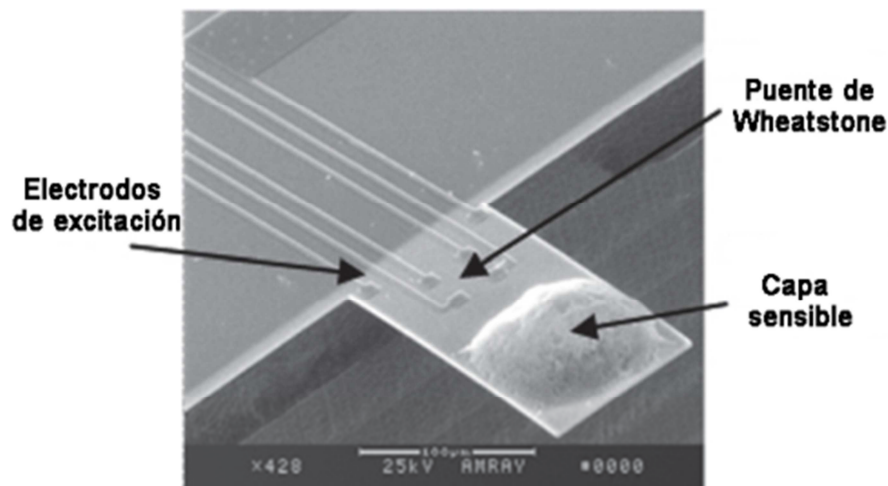


Figura 2.7. Imagen de un cantiléver realizada con un microscopio electrónico (SEM).

Para medir tanto la deflexión como la frecuencia de resonancia se suele utilizar un láser que incide en la punta del cantiléver, reflejando la luz hacia una balanza óptica. Otra forma de medir la deflexión es a través de capas de

piezoeléctricas depositadas sobre el cantiléver, que al deformarse debido a la deflexión producen un cambio de potencial.

- **Sensores basados en ondas acústicas (AW) [20,21,22]:** estos se componen de un sustrato piezoeléctrico en el cual se propaga la onda acústica, el elemento sensible a especies químicas, que permiten que el analito interaccione con la onda acústica, y un transductor que transforma la presencia de estas sustancias en un cambio de frecuencia en la señal de salida (Fig. 2.8), este cambio es proporcional a la concentración de analito que ha sido adsorbido en la capa sensible. Este trabajo está basado en estos dispositivos y por esto se explican más detalladamente en el capítulo siguiente.

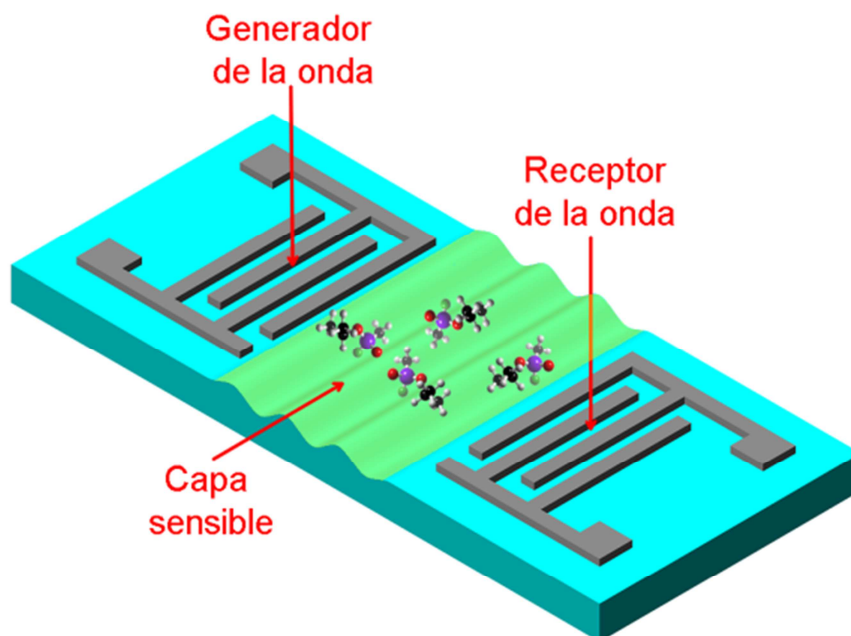


Figura 2.8. Sensor basado en la propagación de ondas acústicas.

2.1.5.2.2. Sensores resistivos de óxidos metálicos

- **Capas delgadas de óxidos metálicos [23]:** Estos sensores están basados en un sustrato que contiene una resistencia calefactora y una capa sensible (Fig. 2.9). Dicha capa sensible suele ser un óxido metálico semiconductor (SnO_2 , ZnO , TiO_2 , WO_3) que puede estar dopado con algún catalizador (Cr, In). Cuando el material semiconductor está a una temperatura entre 200°C y 450°C , los volátiles reaccionan en su superficie haciendo variar su resistencia, que será la magnitud o variable medida.

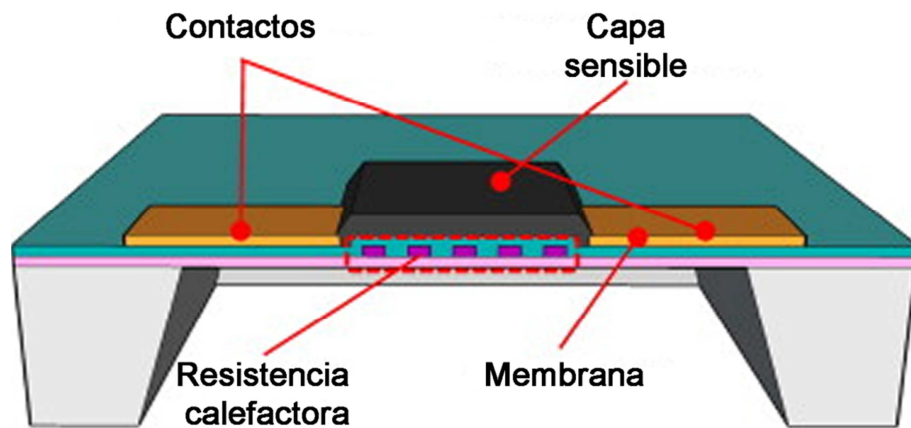


Figura 2.9. Esquema de un sensor resistivo.

- **Nanohilos** [24] y **Nanotubos** [25]. Una mejora de los dispositivos anteriores puede ser el depósito del óxido metálico en forma de nanohilo (Fig. 2.10), ya que tiene mucha mayor área de exposición al gas en relación al volumen de material utilizado. Aprovechando que los nanohilos pueden tener carácter semiconductor, estos se pueden utilizar como sensores con la ventaja anteriormente explicada para los nanohilos, además de funcionar a más bajas temperaturas y responder en tiempos más cortos.

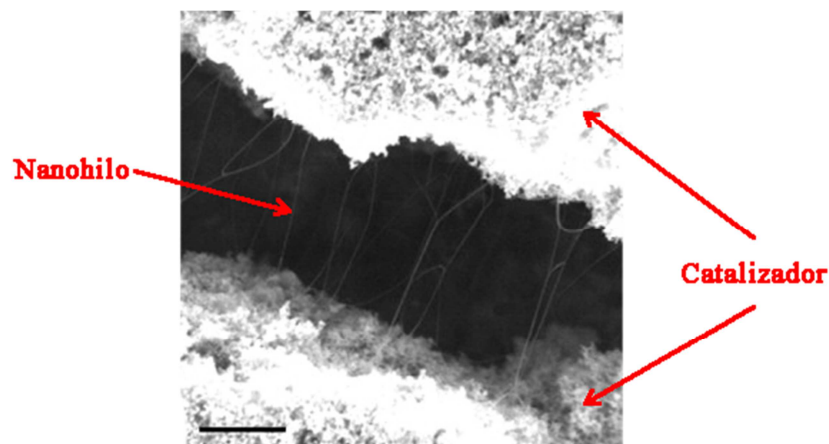


Figura 2.10. Imagen de nanohilos crecidos en una grieta del catalizador, realizada con un microscopio electrónico (SEM).

2.2. Agentes de Guerra Biológica (BWA)

La **Convención para la Prohibición de las Armas Biológicas y Toxínicas (CABT)** se firmó el 10 de abril de 1972 y entró en vigor el 26 de marzo de 1975, cuando veintidós gobiernos depositaron su documentación de ratificación. En España fue ratificada el 1 de junio de 1979. Actualmente se compone de 163 estados y prohíbe el desarrollo, producción, y almacenamiento de armas biológicas y toxínicas. Sin embargo, la no existencia de ningún mecanismo de verificación formal para observar el cumplimiento ha limitado la efectividad de la Convención. (Nota: A julio del 2008, otros 13 Estados adicionales han firmado la BWC aunque todavía no la han ratificado).

Según la Organización del Tratado Atlántico Norte (OTAN) se entiende por:

- **Agente biológico:** cualquier microorganismo o toxina derivada de él, que causa enfermedad en el hombre, plantas o animales o que causa deterioro del material.
- **Arma biológica:** artículo material que proyecta, dispersa o disemina un agente biológico, incluyendo vectores artrópodos.

2.2.1. Características de un agente biológico para ser utilizado como arma biológica

Las principales características que se deben tener en cuenta al tratar a un agente de guerra biológica son:

- **Infectividad:** refleja la facilidad relativa con que los microorganismos se establecen en su hospedador o anfitrión. El número de microorganismos o la cantidad de toxina que debe penetrar en el organismo para iniciar la infección o la intoxicación se denomina dosis infecciosa o de intoxicación.
- **Virulencia:** refleja el grado relativo de gravedad de la enfermedad producida por el organismo. Diferentes microorganismos y diferentes cepas de un mismo microorganismo pueden causar enfermedades con diferente nivel de gravedad.
- **Toxicidad:** refleja la gravedad relativa de la enfermedad o incapacidad producida por una toxina.
- **Patogenicidad:** refleja la capacidad de un agente infeccioso para causar una enfermedad en un anfitrión susceptible.

- **Periodo de incubación:** el tiempo que transcurre desde la exposición hasta que aparecen los primeros síntomas. Este tiempo dependerá de múltiples factores como por ejemplo de la dosis, la virulencia, la vía de entrada, la fase inicial de replicación, los factores inmunológicos del anfitrión, etc.
- **Transmisibilidad:** la facilidad relativa con que un agente se trasmite de un anfitrión a otro y constituye una de las principales preocupaciones en la gestión de un incidente con agentes biológicos. Algunos agentes biológicos pueden ser transmitidos directamente de persona a persona. La transmisión indirecta, a través de vectores artrópodos, puede ser también una medida significativa de difusión.
- **Letalidad:** refleja la facilidad relativa con que un agente causa la muerte en una población susceptible.
- **Estabilidad:** La viabilidad de un agente se ve afectada por varios factores medioambientales, incluyendo la temperatura, la humedad relativa, la contaminación atmosférica, la luz del sol, etc. Una medida cuantitativa de la estabilidad es la tasa de descomposición del agente.

Por tanto un BWA idóneo tendrá una gran capacidad de infectar o intoxicar con pequeñas dosis, siendo de gran utilidad cuando se puede dispersar en forma de aerosol. Además se caracterizan por una alta virulencia o letalidad, un corto periodo de incubación, una rápida aparición de los primeros síntomas, no inmunidad generalizada, resistencia a los tratamientos con medicinas comunes, facilidad para ser almacenado, transportado y diseminado, alta capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales extremas, producción en grandes cantidades con una pequeña infraestructura de laboratorio, finalmente posibilidad de ser perfeccionado mediante ingeniería genética.

2.2.2. Diferentes tipos de agentes biológicos

- **Bacterias:** microorganismos unicelulares que carecen de núcleo diferenciado y se reproducen por división celular sencilla. Su tamaño varía entre 1-10 μm por lo que son visibles en el microscopio óptico. En su mayoría viven en un ambiente externo sin producir enfermedad al hombre, solo unas pocas al lograr multiplicarse en el organismo humano producen la infección.
- **Rickettsias:** género de bacterias con tamaño intermedio entre virus y bacterias, se trata de parásitos intracelulares de mamíferos y artrópodos (pulgas, garrapatas,

piojos, etc.). La vía de infección en el hombre es a través de las picaduras de estos artrópodos o por contacto con alimentos o materiales contaminados.

- **Virus:** organismos biológicos submicroscópicos que requieren la maquinaria de biosíntesis y de generación de energía de células vivas para replicarse, por tanto son parásitos intracelulares de células vegetales, animales o microbianas. Su tamaño está entre 10-200 nm, por lo que escapan al alcance del microscopio óptico, y se requiere un microscopio electrónico para poder verlos.
- **Toxinas:** sustancias tóxicas producidas por la actividad metabólica de algunos seres vivos (animales, plantas o bacterias) cuya utilidad como arma viene limitada por su baja toxicidad, requiriendo su uso en grandes cantidades para ser eficaz como arma biológica.

2.2.3. Principales agentes de guerra biológica

Un ejemplo de agentes biológicos y su dosis infectiva es mostrado en la Tabla 2.2, pero una clasificación más detallada puede ser consultada en el Anexo 1.

Tabla 2.2. Dosis infectiva mínima de los principales agentes biológicos utilizados como armas biológicas.

AGENTE	Nombre común	Dosis Infectiva (aerosol)
Bacillus anthracis	Ántrax	8.000 a 50.000 esporas
Brucella	Brucelosis	10 a 100 organismos
Yersinia pestis	Peste	100 a 500 organismos
Francisella tularensis	Tularemia	10 a 50 organismos
Smallpox o virus de la viruela	Viruela	10 a 100 organismos
Clostridium botulinum	Botulismo	0.001µg de toxina Tipo A
Vibrio Cholerae	Cólera	10-500 organismos

2.2.4. Diferentes métodos de dispersión de agentes biológicos

- **Bioaerosoles:** partículas ultramicroscópicas formadas por material de origen biológico. Son la vía de dispersión de armas biológicas de mayor interés desde el punto de vista militar.
- **Vectores:** algunas enfermedades se propagan por medio de insectos u otros seres vivos como pulgas, ratas, moscas y mosquitos. Los vectores son las principales vías de dispersión de parásitos intracelulares como los virus.

- **Alimentos y agua:** algunos organismos y toxinas pueden persistir en suministros de agua y alimentos, de forma que al ser ingeridos pasan al hombre desarrollando la enfermedad.
- **Hombre:** el hombre también puede ser considerado una fuente de diseminación al transferir de forma inconsciente el agente biológico.

2.2.5. Vía infecciosa de los agentes biológicos

- **Vía respiratoria** (inhalación): A través de las fosas nasales, cuando el agente es transportado en forma de vapor o aerosol.
- **Vía digestiva** (ingestión): Por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con el agente biológico.
- **Vía cutánea** (percutánea): A través de heridas, pequeñas grietas o lesiones de la piel y de las mucosas, aun siendo ellas, en sí mismas, barreras efectivas contra la entrada de agentes biológicos en el organismo.

2.2.6. Sistemas de detección de agentes biológicos

Los sistemas de detección de agentes biológicos (Fig. 2.11) se componen de:

- **Tigger:** Detecta cualquier incremento de partículas en el fondo ambiental.
- **Detector:** Informa si las partículas que se han recogido son de origen biológico o inorgánico.
- **Colector:** Si el tigger ha detectado cambio hay que recoger y concentrar las partículas para su posterior medida.
- **Identificador:** En el caso que el detector determine que las partículas son de origen biológico, estas son analizadas por el identificador. Éste es el elemento más crítico del sistema, pero una vez identificado el agente, se podrán determinar los requisitos de protección.

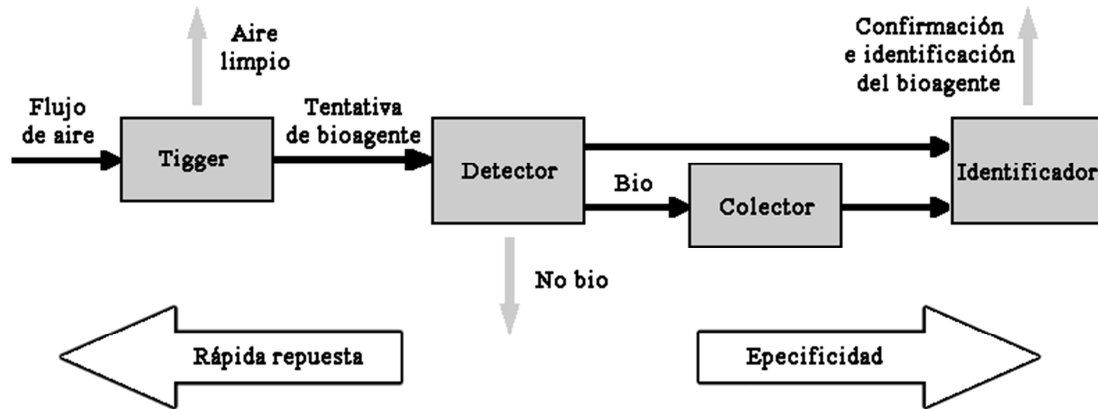


Figura 2.11. Diagrama de bloques para un sistema de detección de bioagentes.

2.2.7. Biosensores como identificadores

Entendemos por biosensor un dispositivo para la detección de un analito, el cual combina un componente de naturaleza biológica que interactúa con el analito, y además suministra selectividad al sensor, y un componente físico llamado transductor, que permite convertir esa interacción en una señal analítica (Fig. 2.12).

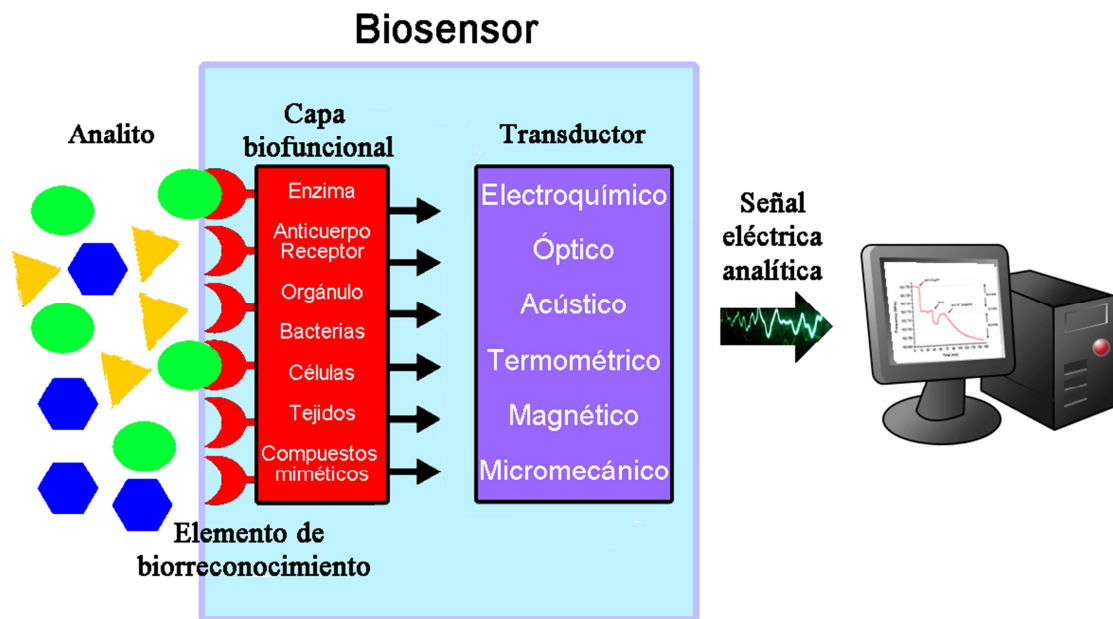


Figura 2.12. Esquema de un biosensor.

2.2.7.1. Sensores biocatalíticos

Están basados esencialmente en la utilización de catalizadores biológicos que producen una reacción química, en esta reacción intervienen varios sustratos o reactantes para generar uno o varios productos.

Los principales elementos de reconocimiento biocatalítico son las **enzimas**, estas son proteínas que catalizan una reacción química mediante la unión de su sustrato específico en una región concreta de la misma, denominado centro activo (Fig. 2.13). Después este reactivo se libera del sitio activo, sin modificar la conformación de la enzima, que puede iniciar nuevamente su trabajo. El tiempo durante el cual la enzima es estable será el tiempo de vida del sensor. Las óxido-reductasas son un ejemplo de enzimas utilizadas normalmente en biosensores, que tal como su nombre indica intervienen como catalizadores en reacciones de oxidación-reducción. Las principales ventajas de utilizar enzimas como elementos de reconocimiento son su rápida respuesta, elevada selectividad, su regeneración y la alta disponibilidad comercial.

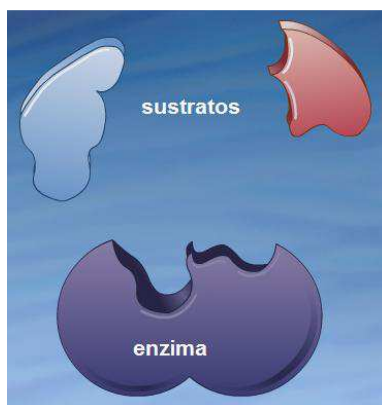


Figura 2.13. Ilustración de como el centro activo y los sustratos son perfectamente complementarios.

Además otros compuestos como células, microorganismos (levaduras y bacterias [26]), tejidos [27] y orgánulos subcelulares se pueden también utilizar como elementos de reconocimiento ya que contienen paquetes enzimáticos. Suelen tener buena estabilidad y vidas útiles prolongadas, pero normalmente presentan baja sensibilidad, una respuesta lenta y selectividad limitada.

2.2.7.2. Sensores de bioafinidad o inmunosensores

Se basan en la interacción entre el analito de interés y el elemento de reconocimiento sin consumir reactantes, ni generar productos, como pasaba en el caso de los biocatalíticos. Una ventaja importante de estos sistemas es que pueden configurarse “arrays” de sensores para la discriminación de analitos. Los principales reactivos de bioafinidad son:

- **Anticuerpo:** es un conjunto de proteínas que se une de manera selectiva (especificidad estructural) a un **antígeno** específico y que en condiciones determinadas también se puede unir a pequeñas moléculas denominadas haptenos. Cada antígeno está definido por su anticuerpo, los cuales interactúan por complementariedad espacial (Fig. 2.14). La zona donde el antígeno se une al anticuerpo recibe el nombre de epítipo o determinante antigénico, mientras que el área correspondiente de la molécula del anticuerpo es el parátipo.

Los anticuerpos policlonales se secretan en contra de un antígeno específico, reconociendo cada uno un epítipo diferente. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune, es decir, todos los clones proceden de una sola célula madre y solo reconocen un epítipo.

El factor más limitante de los inmunosensores es que no pueden ser reutilizados.

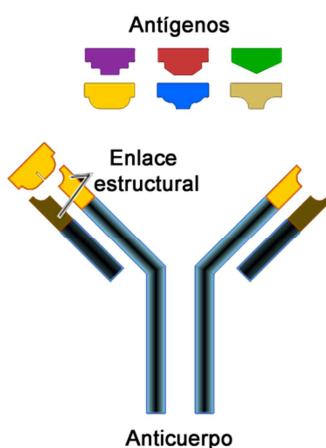


Figura 2.14. Especificidad estructural entre anticuerpo y antígeno.

- **Ácidos nucleicos:** Los ácidos nucleicos son macromoléculas formadas por la repetición de monómeros llamados nucleótidos. Estas cadenas se enlazan

específicamente a su **secuencia complementaria** en el proceso de hibridación (Fig. 2.15). Este proceso es utilizado como método de reconocimiento en los biosensores de análisis de ADN, también conocidos como genosensores.

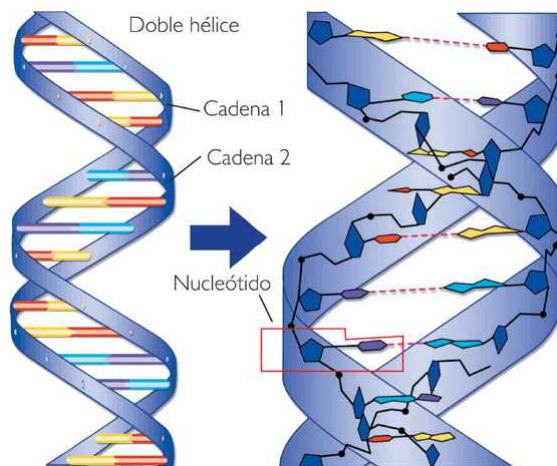


Figura 2.15. Ejemplo de una cadena formada de ácidos nucleicos.

- **Lectinas:** Se enlazan de forma reversible con los **carbohidratos**, tanto si están libres como si forman parte de estructuras más complejas.
- **Polímeros de impresión molecular (PIM):** son materiales biomiméticos que reproducen el sistema de reconocimiento de los sistemas bioquímicos convencionales. Estos son matrices sintéticas con la capacidad de adoptar en su estructura la forma de las moléculas presentes en el medio en el que polimerizan y que permanecen en el material a modo de moldes [28]. Son considerados como anticuerpos artificiales. La principal ventaja frente a otros sistemas biológicos de reconocimiento es su estabilidad.

2.2.7.3. Biosensores electroquímicos

Utilizan las propiedades electroanalíticas que se producen o modifican debido a la interacción entre el analito y el sistema de reconocimiento, proporcionando información analítica cuantitativa y semicuantitativa [29]. Según la propiedad eléctrica que se modifique podemos clasificar estos sistemas de detección electroquímica en:

2.2.7.3.1. Amperimétricos

Basan su funcionamiento en la medida, a un potencial fijo, de las corrientes de Faraday resultantes del intercambio de electrones que se producen entre las enzimas que constituyen el sistema de reconocimiento (electrodo de trabajo) y un electrodo mantenido a un potencial apropiado (electrodo de referencia) [30] (Fig. 2.16). Esta corriente es proporcional a la concentración de analitos en la solución.

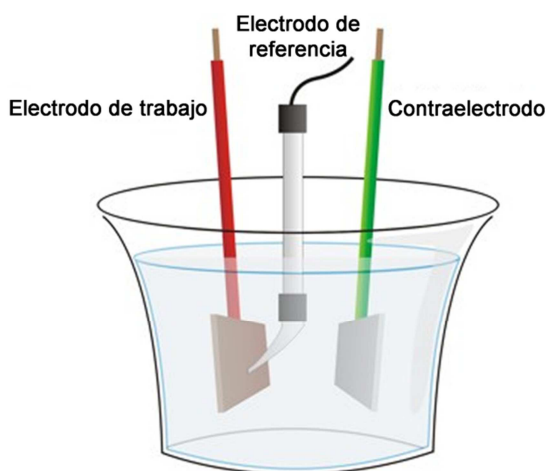


Figura 2.16. Esquema de un biosensor amperimétrico.

2.2.7.3.2. Potenciométricos

Están basados en la medida de la evolución de la diferencia de potencial entre dos electrodos (ley de Nernst), el de referencia a potencial fijo y el de trabajo a potencial variable. En este tipo de biosensores se emplean electrodos selectivos a iones (Ion Selective Electrode, ISE), con los que se determina la variación en la concentración de un ión, inducida mediante una reacción catalizada por una enzima.

2.2.7.3.3. Conductimétricos e impedimétricos

Miden las variaciones en la conductividad de un medio que une dos electrodos, debidas a la transformación catalítica de un sustrato en sus productos correspondientes [31]. También pueden detectar mediante un sistema de electrodos planos interdigitados, a través de la medida de su impedancia (Fig. 2.17).

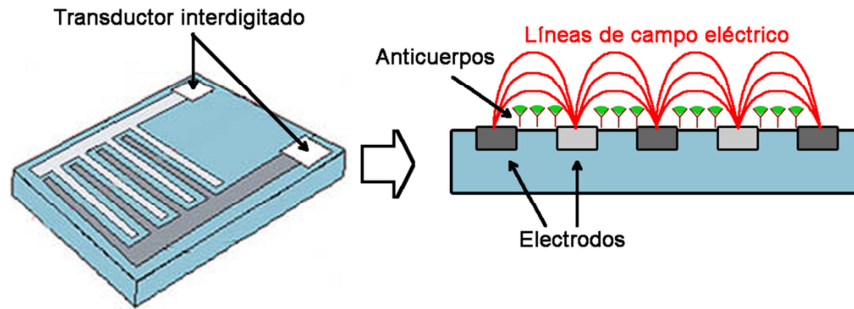


Figura 2.17. Biosensor conductimétrico de electrodos planos.

2.2.7.3.4. Transistores de efecto de campo

Los ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistors) son una variación de los transistores MOSFET (Metal Oxide Screen Field Effect Transistor). Su principio de funcionamiento se basa en el control de flujo de cargas que se produce entre dos electrodos (fuente y drenaje, ambos semiconductores del tipo n) situados sobre una superficie de un elemento semiconductor (tipo p). Un tercer electrodo de naturaleza metálica (puerta) situado entre los dos anteriores cierra el circuito eléctrico. El electrodo metálico esta aislado de los dos anteriores mediante una delgada capa de oxido de silicio (SiO_2). La corriente entre el drenaje y la fuente está directamente relacionada con el voltaje externo aplicado entre la puerta y la fuente [32]. Entonces para convertirlo en un biosensor se inmoviliza una enzima en la superficie del sensor, que al reaccionar con el analito modifica la concentración en el entorno y que por tanto influye en la respuesta del dispositivo (Figura 2.18).

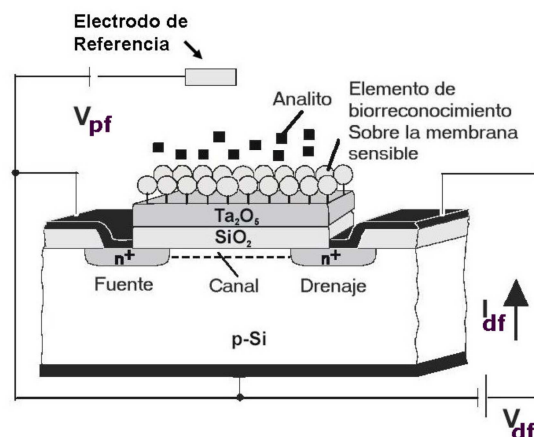


Figura 2.18. Biosensor basado en un transistor ISFET.

2.2.7.4. Biosensores ópticos

Se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la radiación óptica como absorción, emisión, dispersión, polarización, refracción o reflexión, debido a la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento del sensor [33]. Dentro de este tipo de sensores encontramos:

2.2.7.4.1. Optrodos

Se trata de sensores contruidos mediante fibras ópticas, de manera que en uno de sus extremos se inmoviliza el elemento de reconocimiento y en el otro el sistema de detección. Normalmente estos sensores precisan marcadores sensibles a la interacción entre el analito y el receptor (Fig. 2.19).

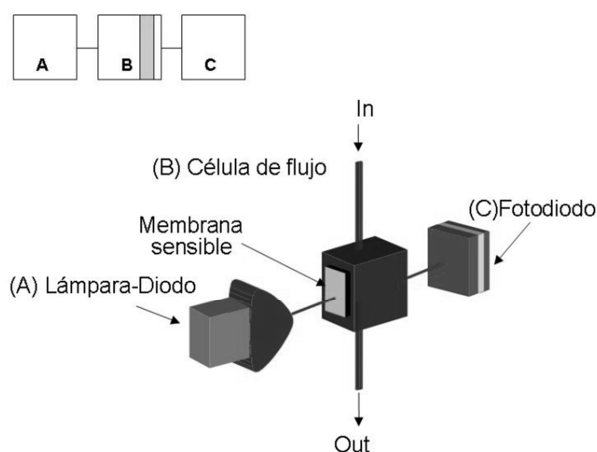


Figura 2.19. Esquema de un optrodo. La presencia de analito modifica la transmitancia de la membrana sensible y por tanto el rendimiento del fotodiodo.

Cuando un haz de luz se transmite en condiciones de reflexión interna total (TIR) en el interior de una guía de ondas, una fibra óptica o un prisma, el campo electromagnético asociado a esta radiación no queda completamente confinado al interior, sino que se extiende a las zonas limítrofes, decayendo exponencialmente con la distancia y originando así las ondas evanescentes. Podemos encontrar varios sensores ópticos basados en este tipo de fenómeno.

2.2.7.4.2. Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

Los plasmones superficiales son oscilaciones colectivas que involucran al campo electromagnético y los electrones de la banda de conducción de un metal. La resonancia de plasmones superficiales se produce cuando un haz de luz polarizada, procedente de un medio con mayor índice de refracción, incide sobre la superficie de una capa metálica delgada (oro o plata). Este fenómeno solo se produce a un determinado ángulo de incidencia del haz de luz, denominado ángulo de resonancia, registrándose la correspondiente pérdida de potencia en el haz reflejado (Figura 2.20). Las variaciones del ángulo de resonancia están relacionadas con los cambios de masa producidos en la superficie sensible, de este modo la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento podrá cuantificarse directamente [34].

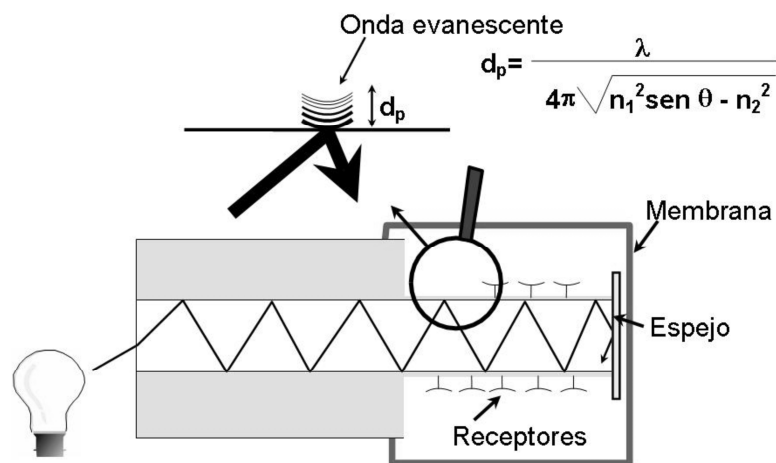


Figura 2.20. Biosensor de fibra óptica basado en el fenómeno de reflexión interna total (TIR).

2.2.7.4.3. Guías de onda plana

Es una variación del SPR, en la que sustituye la capa de metal por una estructura resonante. Así la estructura está constituida por un soporte, de elevado índice de refracción, sobre el que se deposita una capa, por ejemplo de óxido de silicio, en la cual el haz incide con un ángulo determinado (ángulo de resonancia), para introducirse posteriormente en una capa con alto índice de refracción, como por ejemplo óxido de titanio. En esta capa la radiación experimenta una serie de reflexiones, generando un

campo evanescente que se extiende hasta la zona donde se deposita la muestra (Fig. 2.21). Así cualquier variación del índice de refracción en la superficie de la zona de detección, debido a la interacción entre los analitos y el elemento de reconocimiento, produce un cambio del ángulo de resonancia, que puede relacionarse con la concentración del analito [35].

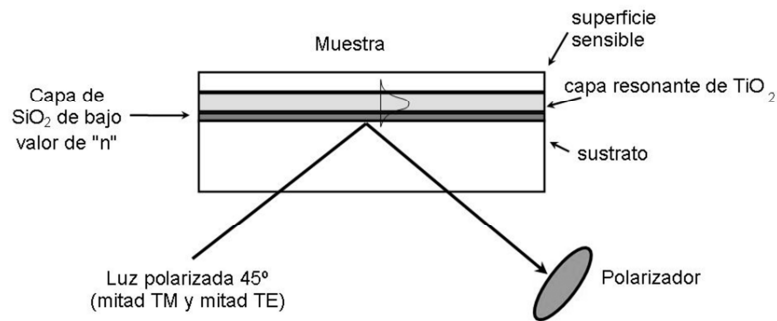


Figura 2.21. Biosensor de guía de onda plana.

2.2.7.4.4. Interferómetros Mach-Zehnder

Basan su funcionamiento en un haz que recorre una guía de onda plana y se dividen en dos haces que recorren idéntica distancia por diferentes caminos, uno de estos caminos es la referencia y en una sección del otro se encuentra la parte sensible al analito. Ambos haces se recombinan al final de los caminos de forma que es posible estudiar el cambio en la intensidad de las interferencias resultantes de la recombinación, determinando si el haz que pasa por la zona sensible está siendo perturbado debido a la interacción entre analito y receptor y por tanto produciendo cambios en el campo evanescente [36] (Fig. 2.22).

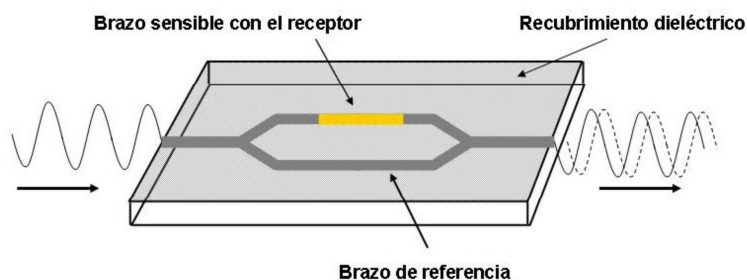


Figura 2.22. Interferómetro de Mach-Zehnder.

2.2.7.4.5. Elipsometría

Es una técnica que mide indirectamente en tiempo real, basándose en el cambio del estado de polarización de la luz que incide sobre un material. Se mide el cambio producido en la polarización de la onda reflejada debido a la interacción del analito con la capa sensible [37]. En este caso la capa sensible son anticuerpos que reaccionan con determinados antígenos (Fig. 2.23).

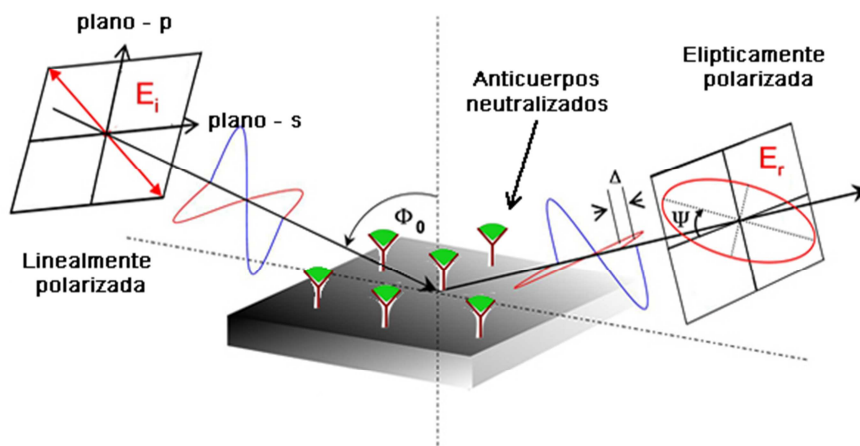


Figura 2.23. Biosensor basado en el cambio de la polarización de la onda reflejada (elipsometría).

2.2.7.5. Biosensores másicos

Los transductores micromecanizados y los dispositivos de ondas acústicas forman parte de los sensores másicos introducidos en el apartado 2.1.5.2.1, ya que se usan tanto en aplicaciones para detección gases como en aplicaciones de detección de material biológico (Fig. 2.24 y 2.25). Cuando se utilizan como biosensores el cambio de masa se produce debido a la interacción entre el elemento de reconocimiento (capa sensible) y el analito [38,39].

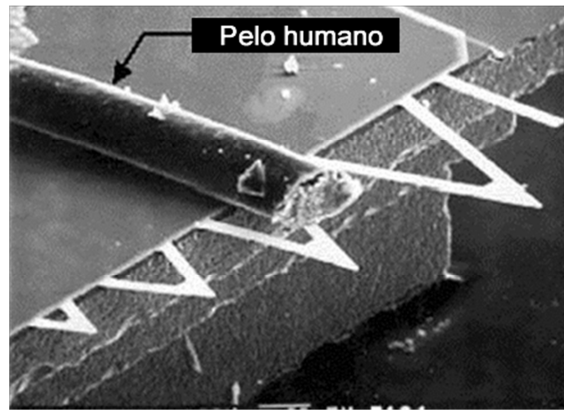


Figura 2.24. Imagen de varios cantilevers realizada por un microscopio electrónico, comparando su tamaño con el de un pelo humano.



Figura 2.25. Sistema de medida basado en microbalanzas de cuarzo

2.2.7.6. Biosensores termométricos

La mayor parte de las reacciones bioquímicas son de carácter exotérmico. De modo que la calorimetría ofrece un sistema de detección para numerosos analitos, especialmente para aquellos que necesitan que se produzca una catálisis enzimática [40]. El caso mas simple de este tipo de sensor es el que se realiza inmovilizando en la superficie del sensor enzimas, o atrapándolas en el interior de una membrana. Además se pueden utilizar sensores Peltier que permiten una considerable reducción del tamaño del dispositivo.

2.2.7.7. Biosensores magnéticos

Se utilizan partículas magnéticas como marcadores unidos a otras biomoléculas o elementos de reconocimiento, estas partículas se suelen preparar a partir de magnetita (Fe_3O_4), gregita (Fe_3S_4), magemita (Fe_2O_3), y varios tipos de ferritas. Para hacer un seguimiento de estas partículas se utilizan los magnetómetros o microscopios basados en un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (Superconducting Quantum Interference Device, SQUID).

Un magnetómetro se basa en la determinación de cambios de frecuencia en la corriente inducida, cuando están presentes partículas paramagnéticas en el interior de una bobina de inducción [41].

Un SQUID es un toroide de material superconductor con una pequeña discontinuidad, que se conoce como “unión Josepshon”, y puede usarse para medir variaciones casi infinitesimales en los campos magnéticos [42].

2.3. Referencias

- [1] Yin Sun and Kwok Y. Ong, Technologies for Chemical Warfare Agents and Toxic Vapors, CRC Press, 2004.
- [2] G.M. Murray, G.E. Southard, Sensors for chemical weapons detection, IEEE Instrumentation and Measurement Society, 2002, pp. 1094-6969.
- [3] Yasuo Seto, et al., Sensing technology for chemical-warfare agents and its evaluation using authentic agents, Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 108, Issues 1–2, 22 July 2005, pp. 193-197.
- [4] G. A. Eiceman, Z. Karpas, Ion Mobility Spectrometry, Second ed., CRC Press, 2005.
- [5] R. Cumeras, I. Gràcia, E. Figueras, L. Fonseca, J. Santander, M. Salleras, C. Calaza, N. Sabaté, C. Cané, Modeling vapor detection in a micro ion mobility spectrometer for security applications, Procedia Engineering, Volume 5, 2010, pp. 1236-1239.

- [6] Herbert H. Hill and Greg Simpson, Capabilities and limitations of ion mobility spectrometry for field screening applications, *Field Analytical Chemistry & Technology*, 1997, Volume 1, Issue 3, pp. 119–134.
- [7] Maarten S. Nieuwenhuizen, Detection and Screening of Chemicals Related to the Chemical Weapons Convention, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006 John Wiley & Sons, pp. 1-17.
- [8] T.P. Logan, E.D. Allen, M.R. Way, A.T. Swift, S.D. Soni, I. Koplovitz, A method for the analysis of tabun in multisol using gas chromatographic flame photometric detection, *Toxicol. Mech. Methods*, 16 (2006), pp. 359–363.
- [9] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.T. Brinkman, Application of microcolumn liquid chromatography and capillary electrophoresis with flame photometric detection for the screening of degradation products of chemical warfare agents in water and soil, *J. Chromatogr. A*, 928 (2001), pp. 187–199.
- [10] Y. Seto, et al., Development of an on-site detection method for chemical and biological warfare Agents, *J. Toxicol*, 2007, *Toxin Rev.* 26: 299–312.
- [11] S.M. Kanan, C.P. Tripp, An infrared study of adsorbed organophosphonates on silica: a prefiltering strategy for the detection of nerve agents on metal oxide sensors, *Langmuir*, 17 (2001), pp. 2213–2218.
- [12] M.E. Webber, M. Pushkarsky, C. Kumar, N. Patel, Optical detection of chemical warfare agents and toxic industrial chemicals: simulation, *J. Appl. Phys.*, 97 (2005), pp. 1–11.
- [13] Fei Yan, Tuan Vo-Dinh, Surface-enhanced Raman scattering detection of chemical and biological agents using a portable Raman integrated tunable sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 121, Issue 1, 30 January 2007, pp. 61-66.
- [14] http://www.ecbc.army.mil/about/features/raman_spectroscopy.htm
- [15] S. Royo, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, A.M. Costero, M. Parra, S. Gil', Chromogenic and fluorogenic reagents for chemical warfare nerve agents' detection, *Chem. Commun.* (2007), pp. 4839–4847.

- [16] K.J. Wallace, J. Morey, V.M. Lynch, E.V. Anslyn, Colorimetric detection of chemical warfare simulants *New J. Chem.*, 29 (2005), pp. 1469–1474.
- [17] L.A. Pinnaduwa, T. Thundat, J.E. Hawka, D.L. Heddena, P.F. Britt, E.J. Houser, S. Stepnowski, R.A. McGill, D. Bubb, Detection of 2,4-dinitrotoluene using microcantilever sensors, *Sens. Actuators B*, 99 (2004), pp. 223–229.
- [18] C. Karnati, H.W. Du, H.F. Ji, X.H. Xu, Y. Lvov, A. Mulchandani, P. Mulchandani, W. Chen, Organophosphorus hydrolase multilayer modified microcantilevers for organophosphorus detection, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007), pp. 2636–2642.
- [19] Jorge Amírola, Angel Rodríguez, Luis Castañer, J.P. Santos, J. Gutiérrez, M.C. Horrillo, Micromachined silicon microcantilevers for gas sensing applications with capacitive read-out, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volumes 111–112, 11 November 2005, pp. 247–253.
- [20] D. Matatagui, J. Martí, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Chemical warfare agents simulants detection with an optimized SAW sensor array, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 154, Issue 2, 20 June 2011, pp. 199–205.
- [21] D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. Aleixandre, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Array of Love-wave sensors based on quartz/Novolac to detect CWA simulants, *Talanta*, Volume 85, Issue 3, 15 September 2011, pp. 1442–1447.
- [22] D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Love-wave sensor array to detect, discriminate and classify chemical warfare agent simulants, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Available online 27 February 2012, In Press.
- [23] N.J. Choi, J.H. Kwak, Y.T. Lim, T.H. Bahn, K.Y. Yun, J.C. Kim, J.S. Huh, D.D. Lee, Classification of chemical warfare agents using thick film gassensor array, *Sens. Actuators B*, 108 (2005), pp. 298–304.
- [24] I. Castro-Hurtado, J. Herrán, G. Ga Mandayo, E. Castaño, SnO₂-nanowires grown by catalytic oxidation of tin sputtered thin films for formaldehyde detection, *Thin Solid Films*, Available online 29 October 2011.

- [25] M.C. Horrillo, J. Martí, D. Matatagui, J.P. Santos, I. Sayago, J. Gutiérrez, I. Martín-Fernández, P. Ivanov, I. Gràcia, C. Cané, Single-walled carbon nanotube microsensors for nerve agent simulant detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 157, Issue 1, 20 September 2011, pp. 253-259.
- [26] I. Gammoudi, H. Tarbague, A. Othmane, D. Moynet, D. Rebière, R. Kalfat, C. Dejous, Love-wave bacteria-based sensor for the detection of heavy metal toxicity in liquid medium, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 26, Issue 4, 15 December 2010, pp. 1723-1726.
- [27] Baoxin Li, Zhujun Zhang, Yan Jin, Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 17, Issues 6–7, 26 June 2002, pp. 585-589.
- [28] Byeung Soo Cheun, Michael Loughran, Tetsuhito Hayashi, Yuji Nagashima, Etsuo Watanabe, Use of a channel biosensor for the assay of paralytic shellfish toxins, *Toxicon*, Volume 36, Issue 10, October 1998, pp. 1371-1381.
- [29] Daniel R. Thévenot, Klara Toth, Richard A. Durst, George S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 16, Issues 1–2, January 2001, pp. 121-131.
- [30] Kanika Singh, Md. Aminur Rahman, Jung Ik Son, Kyung Chun Kim, Yoon-Bo Shim, An amperometric immunosensor for osteoprotegerin based on gold nanoparticles deposited conducting polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 23, Issue 11, 15 June 2008, pp. 1595-1601.
- [31] Vanessa Escamilla-Gómez, Susana Campuzano, María Pedrero, José M. Pingarrón, Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive *Escherichia coli* quantisation, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 24, Issue 11, 15 July 2009, pp. 3365-3371.
- [32] A. Zazoua, S. Zougar, R. Kherrat, M.H. Samar, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid, A. Abbaci, Development of a hexavalent chromium ISFET sensor with a polymeric membrane including tributylphosphate, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 26, Issues 2–3, March 2006, pp. 568-570.

- [33] J.M. Corres, I.R. Matias, J. Bravo, F.J. Arregui, Tapered optical fiber biosensor for the detection of anti-gliadin antibodies, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 135, Issue 1, 10 December 2008, pp. 166-171.
- [34] J. Waswa, J. Irudayaraj, C. DebRoy, Direct detection of *E. coli* O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor, *LWT*, 40 (2007), pp. 187–192.
- [35] Dirk Wildeboer, Pisu Jiang, Robert G. Price, Siyuan Yu, Fiona Jeganathan, Ramadan A. Abuknesha, Use of antibody–hapten complexes attached to optical sensor surfaces as a substrate for proteases: Real-time biosensing of protease activity, *Talanta*, Volume 81, Issues 1–2, 15 April 2010, pp. 68-75.
- [36] B.Y. Shew, Y.C. Cheng, Y.H. Tsai, Monolithic SU-8 micro-interferometer for biochemical detections, *Sensors and Actuators A: Physical*, Volume 141, Issue 2, 15 February 2008, pp. 299-306.
- [37] Cai Qi, Xin-Sheng Tian, She Chen, Jing-Hua Yan, Zhen Cao, Ke-Gong Tian, George F. Gao, Gang Jin, Detection of avian influenza virus subtype H5 using a biosensor based on imaging ellipsometry, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 25, Issue 6, 15 February 2010, pp. 1530-1534.
- [38] Ramos, D., Arroyo-Hernández, M., Gil-Santos, E., Tong, H.D., Van Rijn, C., Calleja, M., Tamayo, J. Arrays of dual nanomechanical resonators for selective biological detection, 2009, *Analytical Chemistry*, 81 (6), pp. 2274-2279.
- [39] M.J. Oliver, J. Hernando-García, P. Pobedinskas, K. Haenen, A. Ríos, J.L. Sánchez-Rojas, Reusable chromium-coated quartz crystal microbalance for immunosensing, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 88, Issue 1, 1 November 2011, pp. 191-195.
- [40] S. Pirvutoiu , I. Surugiu , E. S. Dey , A. Ciucu , V. Magearu and B. Danielsson, Flow injection analysis of mercury(II) based on enzyme inhibition and thermometric detection, *Analyst*, 2001, 126, 1612-1616.
- [41] J Richardson, P Hawkins, R Luxton, The use of coated paramagnetic particles as a physical label in a magneto-immunoassay, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 16, Issues 9–12, December 2001, pp. 989-993.

[42] Y.R. Chemla, H.L. Grossman, Y. Poon, R. Mcdermott, R. Stevens, M.D. Alpert, J. Clarke, Ultrasensitive magnetic biosensors for homogeneous immunoassay, The National Academy of Sciences, 2000, vol. 97, no. 26, 14268-14272.

CAPÍTULO 3

FUNDAMENTO TEÓRICO DE LOS SENSORES MÁSICOS BASADOS EN ONDAS ACÚSTICAS

3.1. Introducción

En el capítulo anterior, tanto en el apartado que revisa los sistemas para detectar CWA, como en el que enumera los diferentes dispositivos utilizados en la detección de bioagentes, se han omitido los sensores basados en ondas acústicas, para dedicarles un capítulo exclusivo y poder explicarlos mas detalladamente, ya que a este grupo pertenecen los dispositivos que se han estudiado para el desarrollo de los sistemas de detección empleados en este trabajo de investigación.

En la actualidad los dispositivos de ondas acústicas (Acoustic Wave, AW) tienen diversas aplicaciones, por un lado los encontramos comercialmente disponibles como filtros, resonadores o líneas de retardo para altas frecuencias con aplicación directa en la industria de las telecomunicaciones [1]. Por otro lado en las últimas décadas hay un creciente desarrollo de estos dispositivos para su aplicación como sensores [2] en diversos campos como medicina [3,4] (detección de virus, toxinas, bacterias,..), medioambiente [5] (detección de gases), alimentación [6,7,8] (detección de aromas, toxinas,...), detección de magnitudes físicas (presión, medidas de alta tensión,...). El concepto de dispositivo AW como sensor másico (o gravimétrico) nace en 1959 con Sauerbrey [9] cuando relaciona el desplazamiento de la frecuencia de resonancia con un incremento de masa en la superficie de una balanza de cuarzo (QCM).

Las partes fundamentales de un sensor gravimétrico son:

- **Sustrato:** El sustrato puede ser piezoeléctrico o estar recubierto de una capa delgada de material piezoeléctrico para poder transformar la energía eléctrica en mecánica y viceversa. Por el sustrato viaja la onda con una determinada velocidad de fase, siendo el principio de detección de los sensores gravimétricos la variación de esta velocidad debido a la interacción de la onda con los analitos.
- **Capa sensible:** elemento sensible a especies químicas o elementos biológicos de reconocimiento (inmunosensores), que permite que el analito interaccione con la onda acústica.
- **Transductor:** electrodo que transforma la detección de analitos en un cambio de frecuencia en la señal de salida. Este cambio es proporcional a la concentración de analito que ha sido adsorbido en la capa sensible.

3.2. Generación de ondas acústicas en sustratos piezoeléctricos

Todas las ondas conocidas, exceptuando las electromagnéticas, necesitan un medio elástico para propagarse. En el caso de ondas acústicas, pueden ser transmitidas a través de gases, líquidos y sólidos, viajando más rápido en estos últimos. A lo largo del medio las ondas transportan energía pero no materia, es decir, la perturbación se propaga a lo largo del material, pero las partículas solo vibran respecto al punto de equilibrio (posición de mínima energía).

Los dispositivos AW basan su funcionamiento en la generación de ondas acústicas debido a las propiedades piezoeléctricas de algunos materiales cristalinos, los más comunes son el cuarzo (SiO_2), el niobato de litio (LiNbO_3), tantalato de litio (LiTaO_3), óxido de zinc (ZnO) y el nitrato de aluminio (AlN). El efecto piezoeléctrico es el fenómeno que permite transformar la energía de una señal eléctrica alterna en una onda acústica y viceversa, con un coeficiente de conversión que depende del factor de acoplamiento electro-acústico de cada material piezoeléctrico.

3.2.1 Efecto piezoeléctrico

El efecto piezoeléctrico es una propiedad por la cual algunos materiales al ser sometidos a tensiones mecánicas adquieren una polarización eléctrica, apareciendo una diferencia de potencial y cargas eléctricas en su superficie. Este fenómeno puede funcionar en

sentido inverso, normalmente conocido como efecto piezoeléctrico inverso, los materiales se deforman bajo la acción de fuerzas internas al ser sometidos a un campo eléctrico. Además ambos efectos son reversibles para casi todos los materiales, es decir, cuando cesa la presión el material recupera su forma original y desaparecen las cargas superficiales. En el caso del efecto piezoeléctrico inverso al cesar el campo eléctrico desaparecen las cargas superficiales y el material recupera su forma original.

Según la ley de Hooke, para pequeñas deformaciones estáticas de un sólido elástico y no piezoeléctrico, la tensión mecánica y la deformación están relacionados por:

$$T_{ij} = c_{ijkl} \cdot S_{kl} \quad (3-1)$$

siendo, T_{ij} , las componentes del tensor de segundo orden de esfuerzo mecánico o tensiones mecánicas [$\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$], S_{kl} , las componentes del tensor de deformación de segundo orden [adimensional], y c_{ijkl} , son las constantes de rigidez [$\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$].

En el caso de materiales piezoeléctricos, debido al acoplamiento entre propiedades mecánicas y eléctricas, la ecuación de la tensión mecánica se extiende a:

$$T_{ij} = c_{ijkl} \cdot S_{kl} - e_{kij} \cdot E_k \quad (3-2)$$

donde e_{kij} , es la componente piezoeléctrica [$\text{C} \cdot \text{m}^{-2}$], y E_k es la componente k-ésima del campo eléctrico [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$].

Por otro lado para materiales no piezoeléctricos el desplazamiento eléctrico, D [$\text{C} \cdot \text{m}^{-2}$], está relacionado con el campo eléctrico aplicado por:

$$D = \epsilon_r \epsilon_0 E \quad (3-3)$$

siendo ϵ_r , la constante dieléctrica relativa, y ϵ_0 la permitividad del vacío [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$]. Pero en el caso de materiales piezoeléctricos la ecuación anterior se extiende a:

$$D_m = e_{mkl} \cdot S_{kl} + \epsilon_{mk} \cdot E_k \quad (3-4)$$

donde ϵ_{mk} , es la componente del tensor de segundo orden de la permitividad.

En general podremos definir el efecto piezoeléctrico tensorialmente como:

$$\begin{array}{ccc}
 & \text{Matriz} & \text{Matriz} \\
 & \text{de rigidez} & \text{piezoeléctrica} \\
 & & \text{inversa} \\
 \begin{bmatrix} T_1 \\ T_2 \\ T_3 \\ T_4 \\ T_5 \\ T_6 \\ D_1 \\ D_2 \\ D_3 \end{bmatrix} = & \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} & c_{14} & c_{15} & c_{16} \\ c_{12} & c_{22} & c_{23} & c_{24} & c_{25} & c_{26} \\ c_{13} & c_{23} & c_{33} & c_{34} & c_{35} & c_{36} \\ c_{14} & c_{24} & c_{34} & c_{44} & c_{45} & c_{46} \\ c_{15} & c_{25} & c_{35} & c_{45} & c_{55} & c_{56} \\ c_{16} & c_{26} & c_{36} & c_{46} & c_{56} & c_{66} \\ e_{11} & e_{12} & e_{13} & e_{14} & e_{15} & e_{16} \\ e_{21} & e_{22} & e_{23} & e_{24} & e_{25} & e_{26} \\ e_{31} & e_{32} & e_{33} & e_{34} & e_{35} & e_{36} \end{bmatrix} & \begin{bmatrix} e_{11} & e_{21} & e_{31} \\ e_{12} & e_{22} & e_{32} \\ e_{13} & e_{23} & e_{33} \\ e_{14} & e_{24} & e_{34} \\ e_{15} & e_{25} & e_{35} \\ e_{16} & e_{26} & e_{36} \\ \varepsilon_{11} & \varepsilon_{12} & \varepsilon_{13} \\ \varepsilon_{12} & \varepsilon_{22} & \varepsilon_{23} \\ \varepsilon_{13} & \varepsilon_{23} & \varepsilon_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \\ S_5 \\ S_6 \\ -E_1 \\ -E_2 \\ -E_3 \end{bmatrix} \\
 & \text{Matriz} & \text{Matriz} \\
 & \text{piezoeléctrica} & \text{dieléctrica}
 \end{array}$$

3.2.2. Propagación de ondas acústicas

La ecuación de movimiento para la propagación de ondas acústicas en un material piezoeléctrico puede ser descrita por la ecuación fundamental de la dinámica como:

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = \frac{\partial T_{ij}}{\partial x_j} \quad \text{con } i, j = 1, 2, 3 \quad (3-5)$$

además la deformación y el desplazamiento mecánico están relacionados por:

$$c_{ijkl} \cdot S_{kl} = c_{ijkl} \cdot \frac{\partial u_l}{\partial x_k} \quad (3-6)$$

Al ser la longitud de onda de las ondas elásticas mucho más pequeña que la de las ondas electromagnéticas se puede hacer la siguiente aproximación:

$$E_k = -\frac{\partial \Phi}{\partial x_k} \quad (3-7)$$

donde Φ es el potencial eléctrico asociado con la onda acústica.

Sustituyendo 3-6 y 3-7 en la ecuación 3-2 resulta:

$$T_{ij} = c_{ijkl} \cdot \frac{\partial u_l}{\partial x_k} + e_{kij} \cdot \frac{\partial \Phi}{\partial x_k} \quad (3-8)$$

La ecuación 3-4 tiene que cumplir la ecuación de Poisson, que para un material dieléctrico en el que no hay cargas libres es:

$$\frac{\partial D_m}{\partial x_j} = 0 \quad (3-9)$$

Combinado las anteriores ecuaciones, la propagación de ondas acústicas en piezoelectricos viene gobernada por:

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = c_{ijkl} \cdot \frac{\partial^2 u_l}{\partial x_j \partial x_k} + e_{nij} \cdot \frac{\partial^2 \phi}{\partial x_j \partial x_k} \quad (3-10)$$

$$0 = e_{mkl} \cdot \frac{\partial^2 u_l}{\partial x_j \partial x_k} - \epsilon_{jk} \cdot \frac{\partial^2 \phi}{\partial x_j \partial x_k} \quad (3-11)$$

Las anteriores ecuaciones pueden ser resueltas para las cuatro variables $u_i=1,2,3$ y Φ con unas determinadas condiciones de contorno, obteniendo la velocidad de propagación y la atenuación de la onda, para un material piezoelectrico dado y una orientación determinada en el caso de ser un material anisotropo.

3.2.3. Perturbaciones en la propagación de ondas acústicas

Las interacciones entre el sustrato por donde viaja la onda y el entorno, tienen como resultado perturbaciones en la onda que se propaga, lo que es debido al cambio de las condiciones de contorno. Este fenómeno es el que nos permite la realización de sensores de ondas acústicas, es decir dispositivos capaces de reaccionar al cambio de las condiciones o composición del entorno con variaciones de las propiedades de las ondas acústicas. Estas perturbaciones tienen como consecuencia la variación de la velocidad y la atenuación. La respuesta de la velocidad de propagación para un sensor basado en la propagación de ondas acústicas, puede ser escrita como:

$$\frac{\Delta V}{V_p} = \frac{1}{V_p} \left(\frac{\partial V}{\partial m} \Delta m + \frac{\partial V}{\partial c} \Delta c + \frac{\partial V}{\partial \epsilon} \Delta \epsilon + \frac{\partial V}{\partial \sigma} \Delta \sigma + \frac{\partial V}{\partial T} \Delta T + \frac{\partial V}{\partial P} \Delta P + \dots \right) \quad (3-12)$$

siendo V_p , la velocidad de fase, que relaciona directamente la longitud de onda, λ , con la frecuencia síncrona f_0 , de la forma $V_p = \lambda \cdot f_0$. Y esta velocidad tal y como se muestra en la ecuación 3-12 puede estar afectada por cambios en las siguientes propiedades:

- **Mecánicas:** como incremento de masa (Δm), o cambio en la constante viscoelástica (Δc).
- **Electroacústicas:** como cambio en la constante dieléctrica ($\Delta \epsilon$), o en la conductividad ($\Delta \sigma$).
- **Otras:** cambios de temperatura (ΔT) y presión (ΔP).

3.3. Dispositivos basados en ondas acústicas

Los materiales piezoeléctricos han permitido el desarrollo de sensores AW. El tipo de onda acústica generada depende tanto de la geometría de los electrodos, que son los transductores, como del sustrato utilizado y su dirección de corte. En primer lugar se puede diferenciar entre ondas que se propagan en todo el volumen (bulk acoustic waves, BAW) del material y ondas que se propagan principalmente en la superficie, es decir, la amplitud de la onda decae muy rápidamente con la profundidad, denominadas ondas acústicas superficiales (surface acoustic waves, SAW). Además en algunos casos se pueden cumplir las dos anteriores condiciones, debido a que el sustrato tiene un espesor desde unas pocas longitudes de onda hasta menos de una longitud de onda (Acoustic Plate Mode, APM). Por tanto los sensores AW los podremos clasificar según la Figura 3.1.

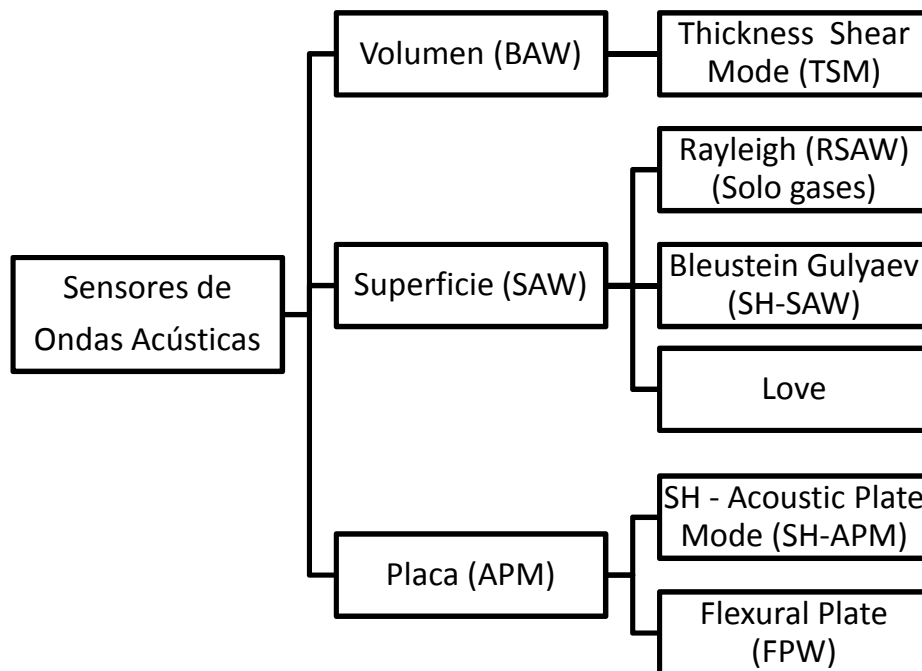


Figura 3.1. Clasificación de los sensores de ondas acústicas según el tipo de onda propagada.

3.3.1. Ondas de volumen (Bulk Acoustic Wave, BAW)

Este tipo de onda es la propagada en las conocidas balanzas de cuarzo (quartz crystal microbalance, QCM) (Fig. 3.2), y su uso tanto en sensores de gases como en biosensores está ampliamente extendido [10-13]. Este dispositivo se caracteriza por tener en sendas caras un electrodo plano. Así, al aplicar una diferencia de potencial entre los electrodos se produce una deformación transversal del cristal, y cuando este potencial es alterno se excita una onda que se propaga en todo el volumen (thickness shear mode, TSM).

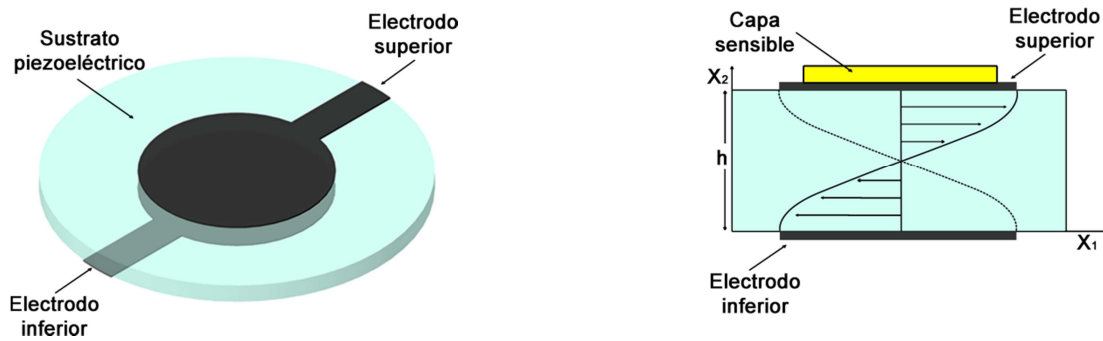


Figura 3.2. Balanza de cuarzo y su modo fundamental de oscilación.

Estos dispositivos se componen de un sustrato de espesor, h , en el cual se ha dispuesto un electrodo en la cara superior y otro en la inferior, siendo estos los únicos lugares donde se genera la oscilación, ya que es la única región del cristal donde $e_{nij} \cdot E_n$ cambia espacialmente. Además cuando opera en vacío las caras del cristal no experimentan una fuerza externa de restauración, siendo considerados contornos que no están sometidos a tensión. Teniendo en cuenta estas consideraciones se obtiene el desplazamiento a través del cristal:

$$u_{x_1}(x_2, t) = u_{x_1 0} \cos(n\pi x_2/h) e^{i\omega t} \quad (3-13)$$

siendo $u_{x_1 0}$ la amplitud del desplazamiento en la superficie. Esta ecuación expresa el movimiento de las partículas a la frecuencia de resonancia, donde la máxima amplitud de vibración, es decir los antinodos, está en las superficies del sustrato. Por tanto la

longitud de onda, λ , correspondiente al primer armónico es el doble del espesor del cristal, cumpliéndose para todos los armónicos la siguiente condición:

$$\lambda = \frac{2h}{n} \text{ con } n = 1, 3, 5, \dots \quad (3-14)$$

La frecuencia, f , y la longitud de onda están relacionadas por la velocidad de fase de la siguiente forma:

$$V_p = \lambda \cdot f \quad (3-15)$$

y por tanto, la frecuencia de oscilación para el primer armónico estará fijada por:

$$f_n = \frac{nV_p}{2h} \text{ con } n = 1, 3, 5, \dots \quad (3-16)$$

La velocidad de fase en el sustrato viene dada por:

$$V_p = \left(\frac{\mu_q}{\rho_q} \right)^{1/2} \quad (3-17)$$

siendo μ_q , el módulo de cizalladura o módulo transversal, y ρ_q , la densidad del sustrato.

El cambio de frecuencia producido por una variación de la densidad de masa superficial, ρ_s , viene relacionado por la conocida ecuación de Sauerbrey [9]:

$$\Delta f = - \frac{2f_1^2 \rho_s}{(\mu_q \rho_q)^{1/2}} = \frac{-2f_0 \rho_s}{\rho_q \lambda} \quad (3-18)$$

Como la vibración se produce en el plano del cristal, es un dispositivo que puede trabajar en medios líquidos, sin tener grandes pérdidas de energía.

3.3.2. Ondas SAW y APM

Para excitar este tipo de onda se utiliza como transductor una metalización sobre la superficie del dispositivo con geometría de electrodos interdigitados (Inter Digital Transducer, IDT) (Fig. 3.3 y 3.4) desarrollados por White y Voltmer [14] en 1965. El número de electrodos dependerá del coeficiente electro-acústico del material

piezoeléctrico, y la zona sensible del dispositivo será el área comprendida entre los dos electrodos interdigitados.

Cuando una señal alterna llega a un IDT, este crea una deformación dinámica en el piezoeléctrico y la energía de esta perturbación viaja a través del sustrato en forma de onda acústica hasta el IDT enfrentado, el cual convierte de nuevo esta onda en una señal eléctrica alterna que será la que se mida. La distancia del centro del IDT emisor al IDT receptor se considera generalmente la distancia que recorre la onda y es denominada L_{cc} . La velocidad de fase de la onda es característica para la dirección de propagación en un material determinado. Para cada modo de propagación la longitud de la onda será $\lambda = d/n$, para $n=1,3,\dots$ y siendo d , la distancia periódica entre los electrodos con la misma polarización. Entonces la frecuencia síncrona la determinará la relación $V_p = \lambda \cdot f$, y dicha frecuencia será una de las magnitudes más útiles de la señal de salida analizada.

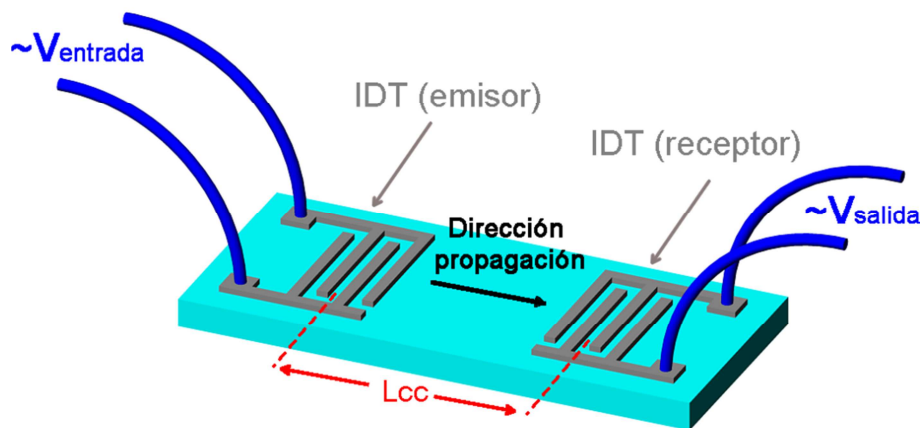


Figura 3.3. Dispositivo basado en ondas acústicas, con un IDT emisor y un IDT receptor de la señal acústica.

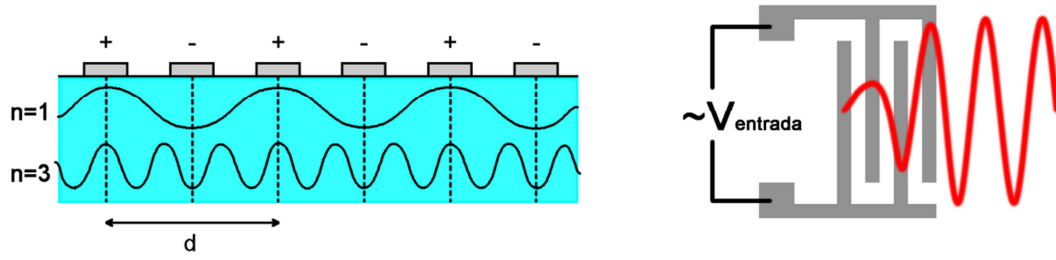


Figura 3.4. Perfil de un IDT con los electrodos polarizados, generando diferentes modos de una onda. Vista superior de un IDT que genera una onda al aplicar una diferencia de potencial alterno entre electrodos.

3.3.3. Ondas de Rayleigh

La existencia de estas ondas fue predicha en sismología por Lord Rayleigh [16] en 1885, consiste en una onda elíptica con una componente perpendicular a la superficie y otra en la dirección de propagación (Fig. 3.5).

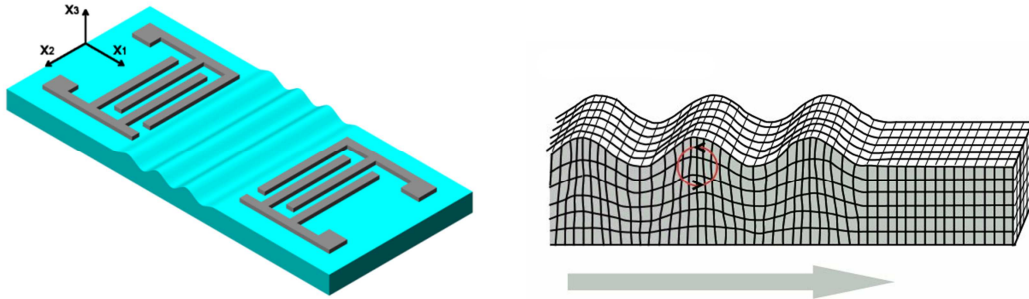


Figura 3.5. Sensor basado en la propagación de ondas Rayleigh

La energía de la onda está confinada a una zona cercana a la superficie, y su amplitud decae exponencialmente con la profundidad. El dispositivo tiene la superficie libre de tracción en ($x_3 = 0$), que separa el espacio libre, de un material con profundidad infinita. Con esta condición de contorno la solución al movimiento de la onda tiene la siguiente forma:

$$u_{x_i}(x_1, x_3, t) = u_{x_i0} e^{-\alpha x_3 - i\omega \left(t - \frac{x_1}{v_p}\right)} \quad \text{con } i = 1, 3, 5, \dots \quad (3-19)$$

siendo u_{x_10} la amplitud de la onda en la superficie ($x_3=0$) para una dirección determinada, y α el coeficiente de amortiguación de la onda en el sustrato.

Fue demostrado por Auld [17] que cuando un dispositivo es recubierto con un material isotrópico, no conductor, cuyo espesor es menor que el 1% de la longitud de onda, el cambio de frecuencia que sufre el dispositivo es:

$$\Delta f = -(k_1 + k_2)f_0^2\rho_s - f_0^2\frac{\mu'h}{v_R^2}\left[4k_1\frac{(\lambda'+\mu')}{(\lambda'+2\mu')} + k_2\right] \quad (3-20)$$

Donde λ' y μ' son los coeficientes de Lamé para dicho material, ρ_s la masa por unidad de área de la capa, k_1 y k_2 son constantes características de cada sustrato, y h es el espesor de la capa. La primera parte de la ecuación es independiente de las constantes mecánicas de la capa, por tanto si se utilizan materiales con μ' apropiado, el segundo término de la ecuación pasa a ser depreciable, llegando a la relación de Wholtjen [18], quien propuso la primera aplicación de estos dispositivos como sensores de gases:

$$\Delta f = -(k_1 + k_2)f_0^2\rho_s \quad (3-21)$$

La densidad superficial está relacionada con la densidad del material, ρ , mediante $\rho_s = \rho \cdot h$, y por tanto pequeñas variaciones de h o ρ causan una variación en la frecuencia de oscilación. Esto pasa también con la microbalanza, pero en este caso el dispositivo tiene mayor sensibilidad.

Este tipo de onda acústica superficial fue una de las primeras y más usadas para el desarrollo de sensores para gases y consecuentemente estos dispositivos son denominados con frecuencia sensores SAW en lugar de sensores Rayleigh, pero es más correcto referirse a ellos como RSAW. El hecho de tener una componente perpendicular a la superficie hace que la onda se disipe por completo en medios líquidos en distancias de unas pocas longitudes de onda y por tanto solo tienen aplicación como sensores de gases [19].

3.3.4. Ondas Horizontales Transversales SAW (SH-SAW)

Estas ondas también son conocidas como Bleustein Gulyaev (BG) [20,21], tienen una componente horizontal, paralela a la superficie del cristal y otra perpendicular a la dirección de propagación (Fig. 3.6). La anterior propiedad es la razón de que también

sean denominadas ondas transversales horizontales o de cizalladura (shear horizontal, SH). Estas ondas solo se propagan en piezoelectricos con alta simetría.

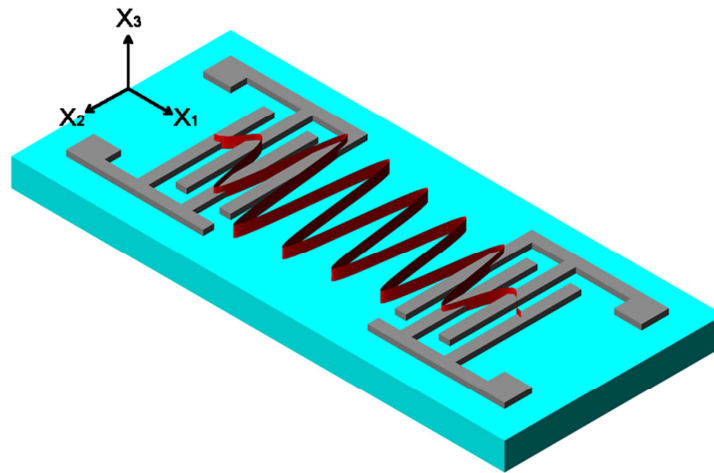


Figura 3.6. Esquema de un dispositivo SH-SAW.

La ventaja de estas ondas sobre las Rayleigh es que al no tener una componente perpendicular al sustrato, la amortiguación de la onda es moderada en líquidos. Pero sin embargo la confinación energética en la superficie no es tan fuerte como en las Rayleigh, y debido a esto su sensibilidad es limitada. Por esta razón para aprovechar este tipo de ondas en sensores, se confina su energía en una capa delgada que actúa como una guía de ondas (capa guía), como es el caso de los sensores Love que se presentan a continuación.

3.3.5. Ondas Love

El matemático y geofísico británico Augustus Edward Hough Love, desarrolló un modelo matemático de estas ondas sísmicas en 1911, por ello este tipo de ondas recibe su nombre, ondas Love. Este pensó que podrían propagarse ondas sísmicas guiadas como consecuencia de la diferencia de densidad entre la corteza y el manto terrestre. Diez años más tarde su predicción fue verificada cuando se reconocieron estas ondas en la tierra. Además propuso un método para conocer el espesor del manto terrestre midiendo las características de propagación de las ondas Love.

Las ondas Love al igual que las Rayleigh son ondas estudiadas en sismología que se han utilizado para el desarrollo de sensores. El fundamento de las ondas Love es la

heterogeneidad del medio en el que se propagan. Así, este tipo de sensores se basan en la excitación de ondas SH-SAW en un piezoeléctrico, guiadas por una capa depositada sobre éste, denominada capa guía. La condición esencial para que se propague una onda Love es que la velocidad de propagación de las ondas acústicas sea mayor en el sustrato que en la capa guía, lo que produce que prácticamente toda la energía de la onda esté confinada en la capa guía. Esta confinación energética hace incrementar la sensibilidad de estos dispositivos con respecto a los SH-SAW convencionales. Además debido a que el movimiento de las partículas es paralelo a la superficie del dispositivo, pueden ser utilizados tanto en líquidos como en gases [22,23]. En estos dispositivos los IDTs también están recubiertos por la capa guía, por lo que estos están protegidos, pudiendo utilizar estos dispositivos en ambientes hostiles sin que sus IDTs se deterioren o destruyan y aislándolos química y eléctricamente si se trabaja en medio líquido (Fig. 3.7 y 3.8).

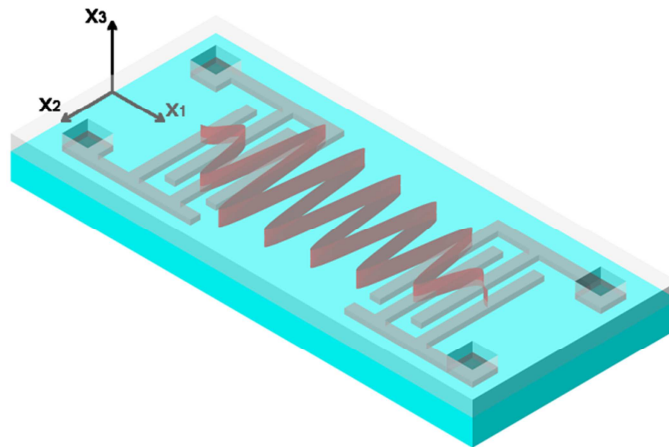


Figura 3.7. Esquema de un dispositivo basado en ondas Love.

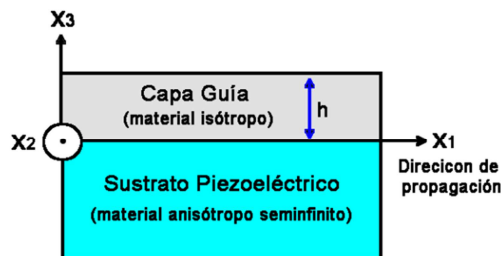


Figura 3.8. Esquema del perfil de un sensor Love.

A lo largo de este trabajo de investigación se ha acompañado el desarrollo de este tipo de sensores con un estudio teórico, en busca de una optimización de dichos dispositivos.

Esta es la razón por la que se presenta a continuación la solución analítica a la ecuación de ondas, hasta llegar a la ecuación de dispersión.

Partimos de las ecuaciones 3-10 y 3-11 para escribir en régimen armónico ($\ddot{u}_i = -\omega^2 u_i$) el sistema de ecuaciones que describe el fenómeno piezoeléctrico:

$$\begin{cases} -\omega^2 \rho u_i = c_{ijkl} \cdot \frac{\partial^2 u_l}{\partial x_j \partial x_k} + e_{kij} \cdot \frac{\partial^2 \phi}{\partial x_j \partial x_k} \\ 0 = e_{mkl} \cdot \frac{\partial^2 u_l}{\partial x_j \partial x_k} - \epsilon_{jkl} \cdot \frac{\partial^2 \phi}{\partial x_j \partial x_k} \end{cases}$$

Haciendo el cambio de variable $X_3 = kx_3$ y con $\frac{\partial}{\partial x_1} = -ik$ (dirección de propagación), siendo k el número de onda, y $\frac{\partial}{\partial x_2} = 0$ (la onda se propaga sobre el plano sagital), se obtiene el sistema:

$$\begin{cases} -\omega^2 \rho u_i = -k^2 c_{i11l} \cdot u_l + k^2 c_{i33l} \frac{\partial^2 u_l}{\partial X_3^2} - ik^2 (c_{i13l} + c_{i31l}) \frac{\partial^2 u_l}{\partial X_3^2} \\ \quad - k^2 e_{1i1} \phi + k^2 e_{3i3} \frac{\partial^2 \phi}{\partial X_3^2} - ik^2 (e_{1i3} + e_{3i1}) \frac{\partial^2 \phi}{\partial X_3^2} \\ -k^2 e_{11l} \cdot u_l + k^2 e_{33l} \frac{\partial^2 u_l}{\partial X_3^2} - ik^2 (e_{13l} + e_{31l}) \frac{\partial^2 u_l}{\partial X_3^2} - \\ \quad - k^2 \epsilon_{11} \phi + k^2 \epsilon_{33} \frac{\partial^2 \phi}{\partial X_3^2} - ik^2 (\epsilon_{13} + \epsilon_{31}) \frac{\partial^2 \phi}{\partial X_3^2} = 0 \end{cases}$$

El anterior sistema de ecuaciones se puede escribir de forma simplificada con:

$$\begin{cases} \Gamma_{im} = c_{i11l} + c_{i33l} \frac{\partial^2}{\partial X_3^2} - i(c_{i13l} + c_{i31l}) \frac{\partial^2}{\partial X_3^2} \\ \gamma_i = e_{1i1} + e_{3i3} \frac{\partial^2}{\partial X_3^2} - i(e_{1i3} + e_{3i1}) \frac{\partial^2}{\partial X_3^2} \\ \epsilon = \epsilon_{11} \phi - \epsilon_{33} \frac{\partial^2}{\partial X_3^2} + 2i\epsilon_{13} \frac{\partial^2}{\partial X_3^2} \end{cases}$$

Debido a la simetría, las componentes c_{ijkl} del tensor pueden ser reducidas a la forma $c_{\alpha\beta}$, teniendo en cuenta que los subíndices α y β varían de 1 a 6 y corresponden a ij y kl respectivamente. La notación sugerida es:

$$(11) \rightarrow 1 \quad (23)=(32) \rightarrow 4$$

$$(22) \rightarrow 2 \quad (13)=(31) \rightarrow 5$$

$$(33) \rightarrow 3$$

$$(12)=(21) \rightarrow 6$$

Definiendo $\phi=u_4$, y con $V_p=\omega/k$, el sistema relativo a la propagación queda como:

$$\begin{bmatrix} \Gamma_{11} - \rho V_p^2 & \Gamma_{12} & \Gamma_{13} & \gamma_1 \\ \Gamma_{12} & \Gamma_{22} - \rho V_p^2 & \Gamma_{23} & \gamma_2 \\ \Gamma_{13} & \Gamma_{23} & \Gamma_{33} - \rho V_p^2 & \gamma_3 \\ \gamma_1 & \gamma_2 & \gamma_3 & -\epsilon \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \\ u_4 \end{bmatrix} = 0 \quad (3-22)$$

El anterior sistema de ecuaciones describe la propagación de una onda según la dirección del eje x_1 , con el plano sagital x_1x_3 . Para continuar con una resolución analítica vamos a reducir el sistema considerando las características de las ondas Love en cuarzo:

- Es una onda transversal horizontal polarizada según x_2 , por tanto $u_1=u_3=0$.
- Como el sustrato es cuarzo, el plano sagital es perpendicular a un eje de orden dos y por tanto $\gamma_1=\gamma_2=\Gamma_{n2}=\Gamma_{2n}=0$ para $n \neq 2$. Por tanto el sistema de ecuaciones (3-22) queda reducido a:

$$\begin{bmatrix} \Gamma_{22} - \rho V_p^2 & \gamma_2 \\ \gamma_2 & -\epsilon \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_2 \\ u_4 \end{bmatrix} = 0 \quad (3-23)$$

- Además el cuarzo tiene un bajo factor de acoplamiento, por tanto los efectos piezoeléctricos son despreciables en un primera aproximación, resultando $\gamma_2=0$ ($e_{ijk}=0$) y $u_4=0$ por lo que el sistema se reduce a una sola ecuación:

$$(\Gamma_{22} - \rho V_p^2)u_2 = 0 \quad (3-24)$$

Ahora, si se deshace el cambio $X_3 = kx_3$ y sustituimos $V_p = -\omega/k$, se obtiene la siguiente ecuación general para el movimiento transversal horizontal en la dirección x_1 y polarizada según x_2 , con respecto a x_3 :

$$c_{44} \frac{\partial^2 u_2}{\partial x_3^2} - 2ikc_{46} \frac{\partial u_2}{\partial x_3} + (\rho\omega^2 - k^2 c_{66})u_2 = 0 \quad (3-25)$$

Este resultado en general es válido para materiales isótropos y ciertos materiales anisótropos correctamente orientados. En particular para el cuarzo solo hay que hacer una rotación correspondiente a los ángulos de Euler ($0^\circ, \theta, 90^\circ$) para obtener el nuevo tensor de las componentes de rigidez.

Una vez establecida la ecuación de propagación, ahora la resolveremos de forma analítica para la estructura multicapa característica de los dispositivos de ondas Love. Así la solución tiene que responder a las siguientes características:

- La onda es guiada por una capa isotrópica (capa guía).
- La onda en el sustrato se comporta como una onda superficial de tal forma que su amplitud será decreciente con la profundidad.
- La onda satisface las siguientes condiciones de contorno:
 - No existen tensiones normales sobre la superficie libre ($x_3=h$).
 - Sustrato semi-infinito y por tanto la amplitud de desplazamiento es nula cuando x_3 tiende a $-\infty$.
 - La capa guía y el sustrato están unidos sin posible desplazamiento de uno sobre otro y por tanto debemos obtener una continuidad en el desplazamiento ($x_3=0$).

Para una mayor claridad en los cálculos, las constantes y variables correspondientes a la capa guía serán acompañadas con el subíndice “h” y las correspondientes al sustrato con el índice “s”.

La capa guía será un medio isotrópico con $c_{44h}=c_{66h}=\mu_h$ y $c_{46h}=0$, siendo μ_h el módulo transversal. Además definimos una constante de anisotropía, Ca , que para la capa guía, al ser isotrópica es 1 y para el sustrato:

$$Ca = \sqrt{\frac{c_{66s}}{c_{44s}} - \frac{c_{46s}^2}{c_{44s}^2}} \quad (3-26)$$

Por tanto la velocidad de la onda transversal para el sustrato y la capa guía serán respectivamente:

$$V_s = Ca \sqrt{\frac{c_{44s}}{\rho_s}} \quad (3-27)$$

$$V_h = \sqrt{\frac{\mu_h}{\rho_h}} \quad (3-28)$$

Resolución de la ecuación de movimiento para la capa guía ($0 \leq x_3 \leq h$)

Teniendo en cuenta que la capa guía es un medio isótropo y la relación 3-28, la ecuación 3-25 se puede escribir para este caso particular como:

$$\frac{\partial^2 u_2}{\partial x_3^2} + k^2 \left(\frac{V_p^2}{V_h^2} - 1 \right) u_2 = 0 \quad (3-29)$$

La solución a esta ecuación de segundo grado con coeficientes constantes, dependerá del signo de $k^2 \left(\frac{V_p^2}{V_h^2} - 1 \right)$, y por tanto resulta:

$$u_2(x_3) = C_1 e^{x_3 \chi_h} + C_2 e^{-x_3 \chi_h} \quad \text{Si } V_p < V_h \quad (3-30)$$

$$u_2(x_3) = U_{0h} \cos(k \chi_h (x_3 - L_h)) \quad \text{Si } V_h < V_p \quad (3-31)$$

Con $\chi_h = \sqrt{\left(\frac{V_p^2}{V_h^2} - 1 \right)}$ y C_1 , C_2 , U_{0h} y L_h , las constantes reales a determinar.

Resolución de la ecuación de movimiento para el sustrato ($x_3 \leq 0$)

La ecuación característica de la ecuación diferencial 3-25 viene dada por:

$$c_{44s} m^2 - 2ikc_{46s} m + (\rho_s \omega^2 - k^2 c_{66}) = 0 \quad (\text{con } c_{44s} > 0)$$

y su discriminante es:

$$\Delta = -4k^2 c_{46s}^2 + 4c_{44s} (\rho_s \omega^2 - k^2 c_{66}) = -4k^2 \left(c_{46s}^2 + c_{44s} \left(\frac{\rho_s \omega^2}{k^2} - c_{66s} \right) \right)$$

e introduciendo las relaciones 3-26, 3-27 y 3-28, se obtiene que:

$$\Delta = -4k^2 c_{44s}^2 C a^2 \left[1 - \frac{V_p^2}{V_s^2} \right] \quad \Delta \in \Re$$

Si $\frac{V_p^2}{V_s^2} > 1$ entonces $V_p > V_s$, siendo $m = \frac{4ikc_{46s} \pm i\sqrt{|\Delta|}}{4c_{44s}}$ un imaginario puro, y por tanto la solución periódica a la ecuación será de la forma

$$u_2(x_3) = C_1 e^{\left(i \frac{4kc_{46s} + \sqrt{|\Delta|}}{4c_{44s}} \right) x_3} + C_2 e^{\left(i \frac{4kc_{46s} - \sqrt{|\Delta|}}{4c_{44s}} \right) x_3}$$

En el caso que $\frac{V_p^2}{V_s^2} < 1$ entonces $V_p < V_s$, siendo $m = \frac{4ikc_{46s} \pm \sqrt{\Delta}}{4c_{44s}}$, y por tanto la solución compleja es:

$$u_2(x_3) = C_1 e^{\left(\frac{4ikc_{46s} + \sqrt{\Delta}}{4c_{44s}}\right)x_3} + C_2 e^{\left(\frac{4ikc_{46s} - \sqrt{\Delta}}{4c_{44s}}\right)x_3}$$

Como la onda que se desplazase en el conjunto sustrato-capa guía tendría una velocidad de fase comprendida entre la velocidad de propagación de una onda SH en el sustrato y la velocidad de propagación de una onda SH en la capa guía, es decir:

$$V_h < V_p < V_s$$

entonces la solución esta expresada por:

$$u_2(x_3) = C_1 e^{\left(\frac{ikc_{46s}}{c_{44s}} + k\chi_s\right)x_3} + C_2 e^{\left(\frac{ikc_{46s}}{c_{44s}} - k\chi_s\right)x_3} \quad (3-32)$$

$$\text{donde } \chi_s = Ca \sqrt{1 - \frac{V_p^2}{V_s^2}}$$

Aplicación de las condiciones de contorno

Para encontrar las constantes de las ecuaciones 3-31 y 3-32, se aplicarán las siguientes condiciones de contorno:

- **No existen tensiones normales sobre la superficie ($x_3 = h$).**

Teniendo en cuenta que el plano superficial de la capa guía y el interplano sustrato-capa guía son perpendiculares a x_3 , y por tanto las tensiones normales serán T_{i3} con $i=1,2,3$; y que la propagación continua en el plano sagital impone que $\frac{\partial}{\partial x_2} = 0$, a partir de la expresión de tensiones mecánicas 3-8 se obtiene la expresión general de tensiones normales:

$$\begin{aligned} T_{i3} &= \frac{\partial}{\partial x_1} (c_{i311}u_1 + c_{i312}u_2 + c_{i313}u_3 + e_{1i3}u_4) \\ &+ \frac{\partial}{\partial x_3} (c_{i331}u_1 + c_{i332}u_2 + c_{i333}u_3 + e_{3i3}u_4) = 0 \end{aligned}$$

Como ya se ha mencionado con anterioridad al ser una onda con polarización horizontal transversal $u_1=u_2=0$, y como los efectos piezoeléctricos se desprecian ($e_{ijk}=0$), la expresión se reduce a:

$$T_{i3} = \frac{\partial}{\partial x_1}(c_{i312}u_2) + \frac{\partial}{\partial x_3}(c_{i332}u_2) = 0 \quad (3-33)$$

Y si tenemos en cuenta que la capa guía es un medio isotrópico, el único coeficiente que es distinto de cero es $c_{2332} \rightarrow c_{44s} = \mu_h$, y por tanto resulta:

$$T_{i3} = \mu_h \left(\frac{\partial u}{\partial x_3} \right)_{x_3=h} = 0$$

Y a partir de la ecuación 3-31 quedaría:

$$\mu_h \left(\frac{\partial u_2}{\partial x_3} \right)_{x_3=h} = -\mu_h U_{0h} k \chi_h \sin(k \chi_h (x_3 - L_h)) = 0 \Rightarrow L = h$$

Resultando la ecuación del desplazamiento de la onda en la capa guía con respecto a x_3 como:

$$u_2(x_3) = U_{0h} \cos(k \chi_h (x_3 - h)) \quad \text{con } 0 \leq x_3 \leq h, k \chi_h > 0 \quad (3-34)$$

- **Amplitud de desplazamiento nula cuando x_3 tiende a $-\infty$.**

Esta condición hace cero el segundo término de la ecuación 3-32, y por tanto queda:

$$u_2(x_3) = C e^{\left(\frac{ikc_{46s}}{c_{44s}} + k \chi_s \right) x_3} \quad \text{con } 0 \leq x_3 \quad (3-35)$$

- **Continuidad de las tensiones normales y del desplazamiento en la interfase del sustrato-capa guía.**

La continuidad en el desplazamiento implica:

$$C = U_{0h} \cos(k \chi_h h) \quad (3-36)$$

Como sabemos, la única componente correspondiente a una tensión normal que se produce en la capa guía es T_{23} y esta tiene que tener continuidad con el sustrato por lo que a partir de la ecuación 3-33,:

$$T_{23} = c_{46}(-ik)u_2 + c_{44} \frac{\partial u_2}{\partial x_3}$$

donde se ha introducido que la propagación en la dirección $x_1 \rightarrow \frac{\partial}{\partial x_1} = -ik$, y se tiene que cumplir que $T_{23}(0^+) = T_{23}(0^-)$ y así:

$$\mu_h \left(\frac{\partial u_2}{\partial x_3} \right)_{x_3=0^+} = -ikc_{46}u_2(0^-) + c_{44} \left(\frac{\partial u_2}{\partial x_3} \right)_{x_3=0^-}$$

Siendo $\mu_h k U_{0h} \text{sen}(k\chi_h h) = -ikc_{46}C + c_{44} \frac{ikc_{46}s}{c_{44}s}C + c_{44}k\chi_s C$, de donde se obtiene la ecuación de dispersión:

$$\tan(k\chi_h h) = \frac{c_{44}s\chi_s}{\mu_h\chi_h} \begin{cases} \chi_h = \sqrt{\left(\frac{v_p^2}{v_h^2} - 1\right)} \\ \chi_s = c_a \sqrt{1 - \frac{v_p^2}{v_s^2}} \end{cases} \quad (3-37)$$

La ecuación de dispersión de las ondas Love permitirá calcular los parámetros relevantes en el desarrollo de los sensores Love. Aunque debemos tener presentes las consideraciones tomadas para resolver las ecuaciones, las cuales se resumen a continuación:

- ✓ La onda tiene una polarización horizontal transversal, siendo el plano sagital perpendicular a un eje cristalográfico de orden 2.
- ✓ Los efectos piezoeléctricos son despreciables, debido a que el factor de acoplamiento electroacústico es muy pequeño.
- ✓ El material de la capa guía es isótropo.
- ✓ La velocidad de la onda resultante siempre tiene que cumplir:
 $V_h < V_p < V_s$.

En resumen, un sensor basado en ondas Love, es un dispositivo en el cual una onda SH es guiada por una capa de un material con las propiedades adecuadas. El material de la capa guía se caracteriza porque las ondas SH se propagan más lentamente que en el sustrato. Por esta razón en el conjunto sustrato-capo guía prácticamente toda la energía de la onda se confina en la capa guía y esta confinación energética dotará al sensor de una alta sensibilidad, notablemente mayor que en los sensores RSAW.

3.3.6. Ondas Horizontales Transversales - APM (Acoustic Plate Mode)

Este tipo de ondas se propaga en sustratos con un espesor de unas pocas longitudes de onda, que sirve como guía de ondas, entonces confina la energía acústica entre la cara superior e inferior, propagándose en el volumen con cierto ángulo con respecto a la superficie [24], y reflejándose en ambas caras (Fig. 3.9), y esto tiene como consecuencias que:

- Debido a que la energía de la onda se distribuye en todo el volumen, la sensibilidad del dispositivo es mayor cuanto mas fino sea el sustrato, siendo por esa razón este parámetro su principal limitación tecnológica en el momento de su fabricación.
- La detección puede ocurrir en las dos caras del dispositivo, facilitando su uso para líquidos ya que puede tener los IDTs por una cara y detectar los líquidos por la opuesta, quedando los IDTs completamente aislados.

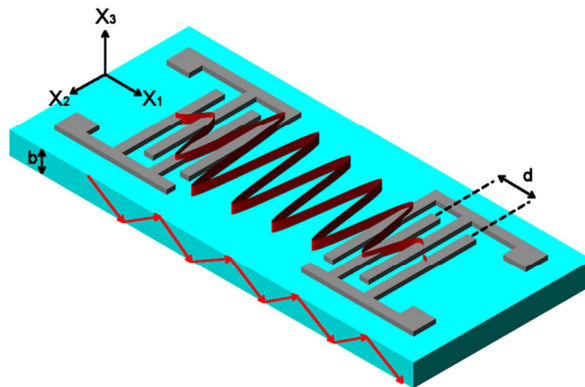


Figura 3.9. Esquema de un dispositivo basado en ondas SH-APM.

Para simplificar el análisis de los sensores APM, la onda SH-SAW guiada en una placa se puede descomponer en varias ondas SH planas que se reflejan en las caras superior e inferior del sustrato con cierto ángulo. La condición de resonancia en las caras impone que el máximo desplazamiento se dé en estas, con una variación sinusoidal entre ellas. Así el desplazamiento de la partícula asociada con el enésimo orden, vendrá dado por [25]:

$$u_2(x_3) = u_{0x_2} \cos\left(\frac{n\pi x_3}{b}\right) e^{(i\omega t - \gamma_N x_1)} \quad (3-38)$$

siendo u_{0x_2} , el desplazamiento de la partícula en la superficie, b , el espesor de la placa, n , el índice del modo transversal, y el término exponencial describe el perfil de desplazamiento a lo largo de la guía de onda (en la dirección x_1) con:

$$\gamma_N = i \left[\left(\frac{\omega}{v_0} \right)^2 - \left(\frac{n\pi}{b} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (3-39)$$

Donde v_0 es la velocidad sin perturbar del modo de orden más bajo.

Haciendo la aproximación del cuarzo como un medio isotrópico, se obtiene que la onda SH-APM más eficiente se da para un transductor de periodo, d , a una frecuencia aproximada por:

$$f_N = \frac{v_0}{h_s} \left[1 + \left(\frac{nd}{2b} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (3-40)$$

En estos dispositivos el cambio de frecuencia y el incremento de masa se relacionan a través de:

$$\Delta f = \frac{J_n \rho_s}{b \cdot \rho_{substrato}} f_0 \quad (3-41)$$

donde $J_0 = 1/2$ y $J_n = 1$, para $n \geq 1$, y ρ_s es la densidad de masa superficial.

3.3.7. Ondas Lamb (Flexural Plate)

Las ondas Lamb [26] fueron descritas por el matemático inglés Horace Lamb. Están relacionadas con las ondas Rayleigh, pudiendo ser consideradas como una composición de dos ondas Rayleigh, cada una propagándose a un lado del sustrato, de forma que si el sustrato tiene mas de dos longitudes de onda de espesor, en lugar de una onda Lamb se propagará una onda Rayleigh. La principal característica de estos dispositivos es el espesor del sustrato, que además es una limitación tecnológica en su desarrollo debido a su delgadez y un problema en su uso debido a su fragilidad. Estas ondas tienen una

componente paralela y otra normal a la superficie (Fig 3.10) [27]. El comportamiento de estos dispositivos se puede resumir en:

- Para espesores muy pequeños con relación a la longitud de onda, la velocidad de fase del modo fundamental antisimétrico, A_0 , se acerca linealmente a cero. Y si el espesor se incrementa, la velocidad de fase se aproxima asintóticamente a la de una onda superficial.
- Para el caso del modo fundamental simétrico, S_0 , es máximo para espesores muy pequeños del sustrato, pero si el espesor va aumentando la velocidad de fase decrece asintóticamente a la de una onda superficial.

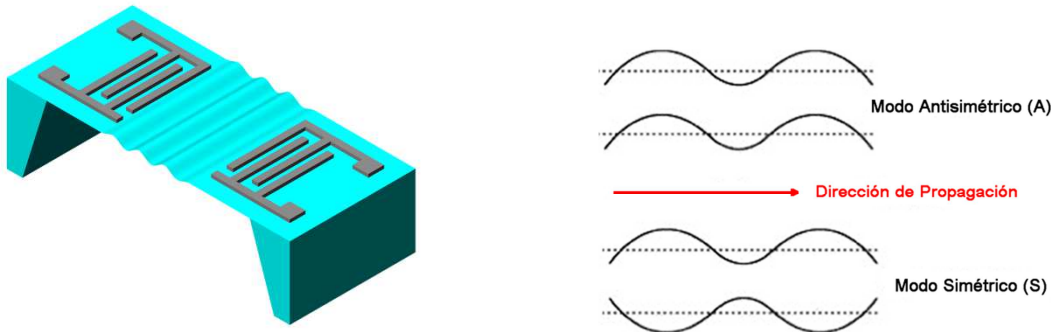


Figura 3.10. A la izquierda esquema de un dispositivo basado en ondas Lamb y a la derecha los diferentes modos de propagación de este tipo de onda.

El uso de capas muy delgadas $d/\lambda \ll 1$ para estos dispositivos es muy interesante, porque la velocidad de fase de A_0 se podrá disminuir hasta valores menores que la velocidad de propagación del sonido en líquidos, y así el sustrato funcionará como una guía de ondas.

El cambio de frecuencia aproximado de estos dispositivos cuando sobre ellos se deposita una película con masa por unidad de área, ρ_s , es:

$$\Delta f = \frac{\rho_s}{2 \cdot d \cdot \rho_{\text{sustrato}}} f_0 \quad (3-42)$$

En resumen, estos dispositivos tienen más alta sensibilidad que los basados en ondas Rayleigh trabajando a la misma frecuencia, pero son muy frágiles y además tienen baja reproducibilidad, aunque pueden trabajar tanto en gases como en líquidos. Al igual que el caso de los dispositivos SH-APM, tienen la ventaja que se puede trabajar con la cara

opuesta a la que contiene los IDTs, pudiendo evitar el contacto de estos con los líquidos de una manera muy sencilla.

3.4. Conclusiones

Se ha realizado un estudio teórico de los dispositivos basados en ondas acústicas superficiales para conocer a priori la configuración óptima para su utilización como sensores.

En el caso de los dispositivos basados en ondas Love, la ecuación de dispersión permite calcular los parámetros más relevantes de su configuración. La principal consideración a tener en cuenta para el desarrollo de un dispositivo Love es que la velocidad de propagación de las ondas horizontales transversales en la capa guía debe ser más lenta que en el sustrato piezoeléctrico. Si la anterior condición se cumple se propagará una onda Love cuyas propiedades dependerán de:

- La longitud de onda asociada a la configuración de los transductores interdigitados.
- El material del sustrato piezoeléctrico.
- El material de la capa guía.
- El espesor de la capa guía.

3.5. Referencias

- [1] Q. Fu, H. Stab, W. Fischer, Wireless passive SAW sensors using single-electrode-type IDT structures as programmable reflectors, *Sensors and Actuators A, Physical*, V.122(2), 203-208, 2005.
- [2] D.S. Ballantine Jr., S.J. Martin, A.J. Ricco, G.C. Frye, H. Wohltjen, R.M. White, E.T. Zellers, Chapter 3 - Acoustic Wave Sensors and Responses, *Acoustic Wave Sensors*, Academic Press, Burlington, 1997.
- [3] Marc D. Schlensog, Thomas M. A. Gronewold, Michael Tewes, Michael Famulok, Eckhard Quandt, A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 101, Issue 3, 15 July 2004, pp. 308-315.

- [4] Junji Ito, Takamichi Nakamoto, Hiroshi Uematsu, Discrimination of halitosis substance using QCM sensor array and a preconcentrator, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 99, Issues 2-3, 1 May 2004, pp. 431-436.
- [5] F. Bender, N. Barie, G. Romoudis, A. Voigt, M. Rapp, Development of a preconcentration unit for a SAW sensor micro array and its use for indoor air quality monitoring, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 93, Issues 1-3, Proceedings of the Ninth International Meeting on Chemical Sensors, 1 August 2003, pp. 135-141.
- [6] Corrado Di Natale, Antonella Macagnano, Eugenio Martinelli, Emanuela Proietti, Roberto Paolesse, Lorena Castellari, Stefano Campani, Arnaldo D'Amico, Electronic nose based investigation of the sensorial properties of peaches and nectarines, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 77, Issues 1-2, 15 June 2001, pp. 561-566.
- [7] Maria E. Escuderos, Sebastian Sanchez, Antonio Jimenez, Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensor arrays selection for olive oil sensory evaluation, *Food Chemistry*, Volume 124, Issue 3, 1 February 2011, pp. 857-862.
- [8] J.P. Santos, M.J. Fernandez, J.L. Fontecha, J. Lozano, M. Aleixandre, M. Garcia, J. Gutierrez, M.C. Horrillo, SAW sensor array for wine discrimination, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 107, Issue 1, pp. 291-295.
- [9] Sauerbrey, G. (1959): The use of quartz crystal oscillator for weighing thin layers and for microweighing applications. *Z. Phys. Chem.* 155, 206.
- [10] Z.H. Ying, Y.D. Jiang, X.S. Du, G.Z. Xie, J.S. Yu, H. Wang, PVDF coated quartz crystal microbalance sensor for DMMP vapor detection, *Sens. Actuators B*, 125 (2007), pp. 167-172.
- [11] Zhihua Ying, Yadong Jiang, Xiaosong Du, Guangzhong Xie, Junsheng Yu, Huiling Tai, Polymer coated sensor array based on quartz crystal microbalance for chemical agent analysis, *European Polymer Journal*, Volume 44, Issue 4, April 2008, pp. 1157-1164.
- [12] Monika Michalzik, Janine Wendler, Jens Rabe, Stephanus Büttgenbach, Ursula Bilitewski, Development and application of a miniaturised quartz crystal microbalance

(QCM) as immunosensor for bone morphogenetic protein-2, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 105, Issue 2, 28 March 2005, pp. 508-515.

[13] Shigeru Kurosawa, Miki Nakamura, Jong-Won Park, Hidenobu Aizawa, Kazunori Yamada, Mitsuo Hirata, Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 20, Issue 6, 15 December 2004, pp. 1134-1139.

[14] R.M. White, F.W. Voltmer, Direct piezoelectric coupling to surface elastic waves, (1965) *Applied Physics Letters*, 7 (12), pp. 314-316.

[15] R.M. White, Surface elastic waves, *Proceedings of the IEEE*, vol. 58, Issue 8, August 1970, pp. 1238-1276.

[16] Rayleigh, L. (J.W. Strutt). On Waves Propagated along the Plane Surfaces of an Elastic Solid. *Proc. London Math. Soc.*, 1885, 17, pp. 4-11.

[17] B.A. Auld, *Acoustic Fields and Waves in Solids*, Jhon Wiley and Sons, New York, 1973.

[18] Hank Wohltjen, Mechanism of operation and design considerations for surface acoustic wave device vapour sensors, *Sensors and Actuators*, Volume 5, Issue 4, July 1984, pp. 307-325.

[19] D. Matatagui, J. Martí, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Chemical warfare agents simulants detection with an optimized SAW sensor array, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 154, Issue 2, 20 June 2011, pp. 199-205.

[20] Jeffrey L. Bleustein, A new surface wave in piezoelectric materials, *Appl. Phys. Lett.* 13, 412 (1968).

[21] Yu. V. Gulyaev, Electroacoustic surface waves in solids, *Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters*, Vol. 9, p.37.

- [22] D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. Aleixandre, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Array of Love-wave sensors based on quartz/Novolac to detect CWA simulants, *Talanta*, Volume 85, Issue 3, 15 September 2011, pp. 1442-1447.
- [23] D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Discrimination and classification of chemical warfare agent simulants using a Love-wave sensor array, *Procedia Engineering*, Volume 25, 2011, pp. 23-26.
- [24] Corinne Dejous, Michel Savart, Dominique Rebiere, Jacques Pistre, A shear-horizontal acoustic plate mode (SH-APM) sensor for biological media, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 27, Issues 1-3, Eurosensors VIII, June 1995, pp. 452-456.
- [25] S.J. Martin, A.J. Ricco, T.M. Niemczyk, G.C. Frye, Characterization of SH acoustic plate mode liquid sensors, *Sensors and Actuators*, Volume 20, Issue 3, 1 December 1989, pp. 253-268.
- [26] H. Lamb, On Waves in an Elastic Plate, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A* 93, 114–128
- [27] I.-Y. Huang, M.-C. Lee, C.-H. Hsu, C.-C. Wang, Development of a flexural plate-wave (FPW) immunoglobulin-E (IgE) allergy bio-sensing microsystem, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 162, Issue 1, 20 February 2012, pp. 184-193.

CAPÍTULO 4

DESARROLLO DE DISPOSITIVOS MÁSICOS. SISTEMAS EXPERIMENTALES DE MEDIDA Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE DATOS

La parte correspondiente a la fabricación en sala blanca de los dispositivos diseñados en este trabajo, se ha llevado a cabo en colaboración con el Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

4.1. Generalidades de los dispositivos desarrollados

Los diferentes dispositivos de ondas acústicas que podemos encontrar con aplicaciones como sensores másicos son principalmente: resonadores [1,2,3] y líneas de retardo [4-7]. Los diseños de los dispositivos empleados en este trabajo se basan en una configuración de líneas de retardado (Fig. 4.1), es decir, los centros de los IDTs están separados por una distancia, L_{cc} , quedando una zona entre ellos libre de electrodos. Como la onda se propaga con velocidad determinada, transcurre un tiempo característico desde que esta se genera en un IDT hasta que se reconvierte en una señal eléctrica alterna en el otro, llamado tiempo de retardo, que se invierte casi por completo en que la señal acústica recorra el espacio entre los dos IDTs. Las principales ventajas de estos dispositivos son: que tienen un área sensible en la que pueden trabajar sin que se interfiera con los IDTs, y además como la amplitud de la onda está relacionada con la

separación entre los IDTs se pueden ajustar para optimizar el área sensible, que está directamente relacionada con la sensibilidad del dispositivo.

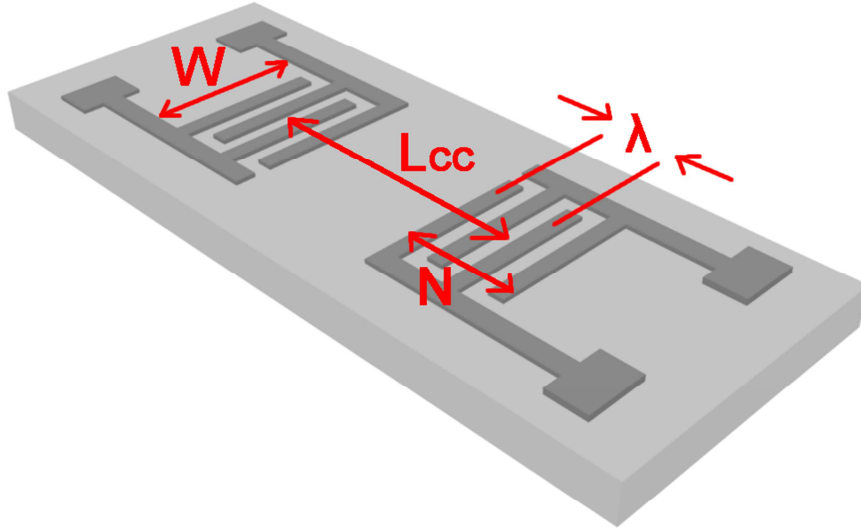


Figura 4.1. Esquema de una línea de retardo, caracterizada por: la longitud de onda, λ , la apertura, W , el número de repeticiones de la estructura periódica de los electrodos que forman los IDTs, N , y la distancia centro a centro de los IDTs, L_{cc} .

Dentro de la variedad de sustratos piezoeléctricos mencionados en el apartado 3.2, se ha elegido el cuarzo como sustrato único para el desarrollo de todos los dispositivos de ondas acústicas presentados en este trabajo. Aunque este tiene un coeficiente de acoplamiento muy pequeño y por tanto se necesita un número elevado de electrodos para generar una onda con amplitud aceptable, es ideal para la fabricación de osciladores y sensores estables, sobre todo debido a que su coeficiente térmico es uno de los más estables en las temperaturas próximas a la temperatura ambiente, de los materiales piezoeléctricos, especialmente si utilizamos el corte ST (stable temperature).

Los IDTs de los dispositivos se han fabricado mediante metalización de aluminio, realizada por pulverización catódica, siendo el espesor de 200 nm y utilizando técnicas aditivas estándar de litografía, más conocidas por su nombre en inglés “lift-off” (Fig. 4.2). Los IDTs que se han utilizado son bidireccionales, es decir, la mitad de la energía se propaga en forma de onda acústica hacia el IDT enfrente y la otra mitad hacia el borde del dispositivo. Cuando la onda acústica llega al borde del dispositivo se refleja y

produce interferencias con la onda de inter3s. Por esta raz3n la onda que se propaga hacia el borde del dispositivo debe ser disipada, lo cual se consigue recubriendo el 3rea entre el borde del dispositivo y el IDT con silicona, que amortigua las reflexiones, y por tanto evita las interferencias de forma sencilla y eficaz.

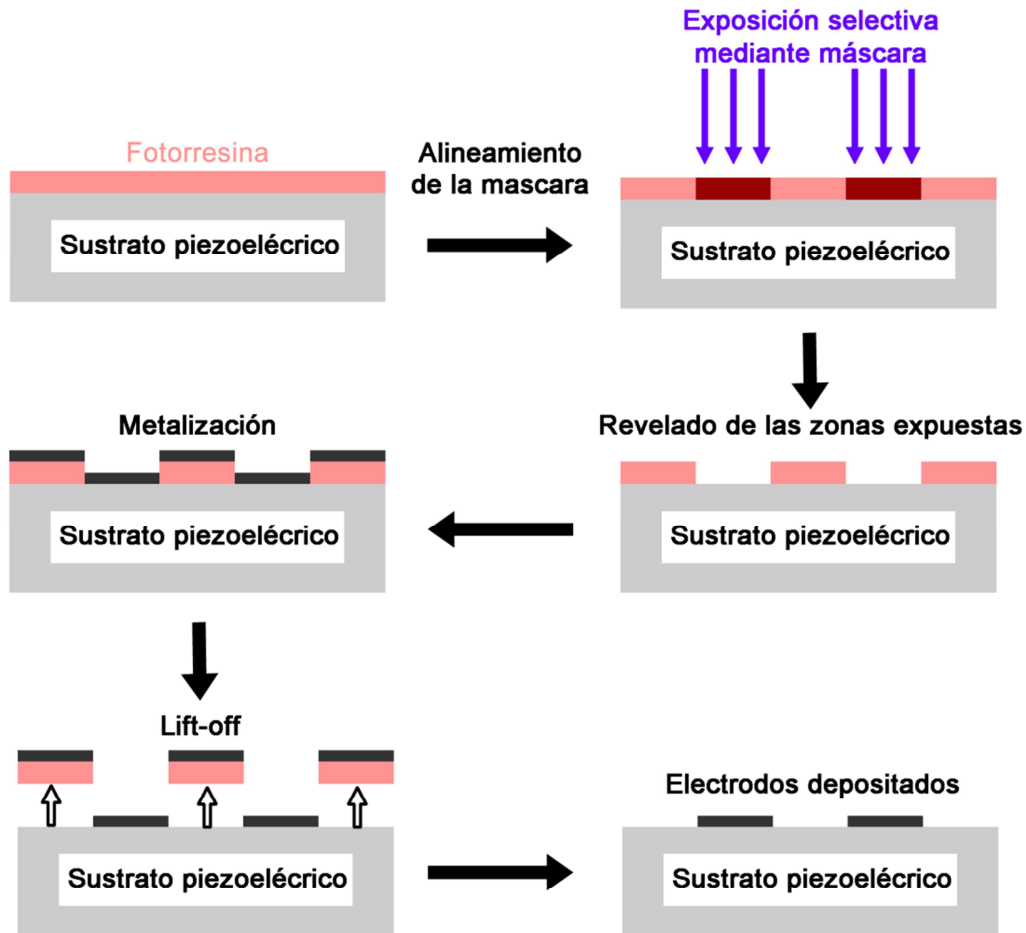


Figura 4.2. Proceso de litograf3a aditiva o "lift-off" para la fabricaci3n de los electrodos sobre el sustrato piezoel3ctrico.

A lo largo de este trabajo de investigaci3n se han desarrollado diferentes dispositivos, y dependiendo del estado f3sico en que se encuentra la muestra a detectar se pueden diferenciar en dos grupos: los que trabajan en medio gaseoso y los que lo hacen en medio l3quido. Con la finalidad de poder incorporar estos dispositivos en los sistemas dise1ados, se han fijado sus dimensiones para utilizar frecuencias de resonancia del mismo orden.

4.2. Instrumentación para caracterizar los sensores

- Analizador de redes vectorial (Agilent 5070B): mide propiedades de amplitud y fase, especialmente aquellas propiedades asociadas con la reflexión y la transmisión de señales eléctricas. Los analizadores de redes se usan para medir en altas frecuencias, operando en los rangos de 9 kHz hasta 110 GHz (Fig. 4.3).

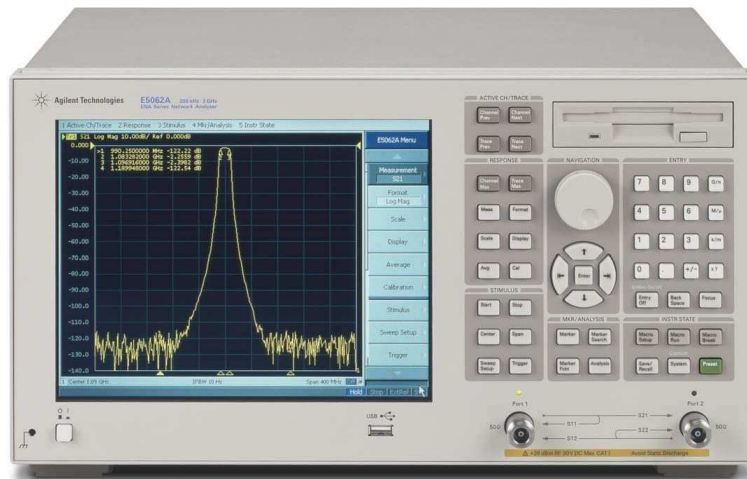


Figura 4.3. Analizador de redes vectorial.

- Analizador de espectros (Agilent 9320A): permite medir y visualizar la potencia RF a la entrada del instrumento en función de la frecuencia. Esto lo hace en un rango de frecuencias lo bastante amplio como para que incluya todo el espectro de interés de la señal bajo análisis. Frecuentemente se presenta la potencia en forma logarítmica (dBm) ya que permite un análisis más preciso de las partes débiles del espectro (Fig 4.4).

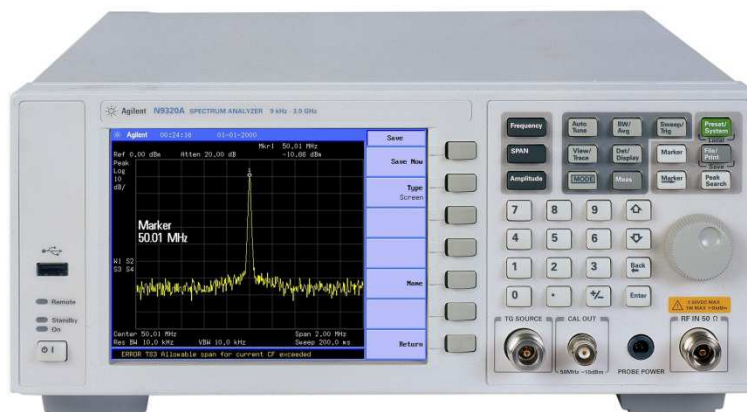


Figura 4.4. Analizador de espectros.

- Perfilómetro por contacto (Veeco Dektak Profilometer - stylus of 2.5 μm): Una aguja de diamante se desplaza horizontalmente por la superficie de la muestra, con una velocidad y una fuerza de contacto específicas. Mientras la aguja se está desplazando se mide su desplazamiento vertical, obteniendo de este modo el perfil de la superficie por el que ha pasado la aguja. El perfilómetro utilizado puede medir variaciones en el perfil de una superficie de 10 nm a 1 mm. Por otro lado el diámetro de la punta varía desde 20 nm a 25 μm , marcando la resolución horizontal del escaneo (Fig 4.5).

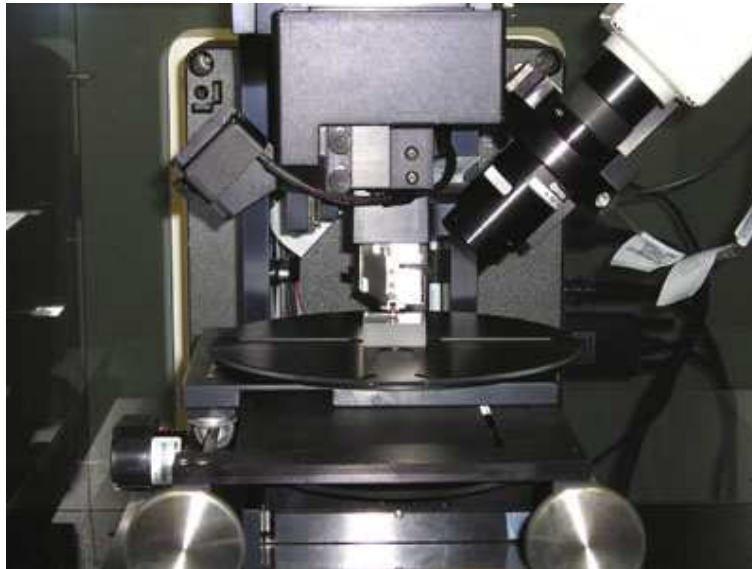


Figura 4.5. Imagen de un perfilómetro por contacto.

- El Microscopio electrónico de barrido o SEM (FEG-SEM, Nova Nanosem 230 FEI Company equipment, Hillsboro, OR): utiliza un haz de electrones para formar una imagen. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite enfocar a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución. Características espacialmente cercanas en la muestra se pueden examinar a una alta magnificación.

4.3. Dispositivos másicos para la detección de compuestos volátiles

A lo largo de este trabajo se desarrollan diferentes dispositivos para la detección de compuestos volátiles, todos ellos basados en ondas acústicas superficiales, en unos se

propagan ondas RSAW explicadas en el apartado 3.3.3, y en otros se propagan ondas Love explicadas en el apartado 3.3.5.

4.3.1. Dispositivos másicos basados en ondas Rayleigh (RSAW)

En el corte ST del cuarzo las ondas Rayleigh se propagan en la dirección x del cristal. Generar una onda en una dirección determinada se consigue mediante una correcta disposición de los IDTs, es decir, la periodicidad de los electrodos debe estar en la misma dirección que en la que deseamos que se propague la onda. En el apartado 3.3.3 se ha mencionado que las ondas Rayleigh tienen una componente transversal y otra longitudinal, así la velocidad con que se propaga una onda Rayleigh depende tanto de la velocidad de propagación transversal, V_T , como de la longitudinal, V_L , que a su vez dependen de las componentes del tensor de rigidez de la siguiente manera $V_T = \sqrt{c_{66}/\rho}$ y $V_L = \sqrt{c_{11}/\rho}$. Estos coeficientes se obtienen rotando el tensor de rigidez en los ángulos de Euler determinados para la dirección x del corte ST, que son (0, 132.75, 0) (ver Anexo 2). Esta velocidad tiene un valor de $3158 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ cuando se propaga en la dirección x del corte ST [8].

Es conveniente desde el punto de vista operativo que todos los dispositivos SAW funcionen a frecuencias similares. El rango elegido está comprendido entre 150 y 200 MHz, por esta razón se ha diseñado un dispositivo RSAW con una longitud de onda, $\lambda = 20 \text{ }\mu\text{m}$. A partir de la velocidad de propagación de la onda se obtiene que la frecuencia de trabajo es 157.9 MHz. Una λ igual a $20 \text{ }\mu\text{m}$ requiere que tanto la anchura de cada electrodo como el espacio entre ellos sea igual a $5 \text{ }\mu\text{m}$. Además se ha elegido una apertura mucho mayor que la longitud de onda, $W = 100 \lambda$, para direccionar el haz hacia el IDT enfrenteado, de forma que se garantice que toda la energía emitida por el IDT emisor en esa dirección sea recibida por el IDT receptor de la señal. La separación entre los centros de los IDTs, L_{cc} , ha sido 200λ y el número de repeticiones de electrodos en cada IDT, N , ha sido 100.

Como consecuencia de los parámetros fijados anteriormente, las dimensiones seleccionadas para los dispositivos para compuestos volátiles son 9 mm de largo, 4 mm de ancho y 0.5 mm de espesor. Con estas dimensiones se obtienen aproximadamente 180 dispositivos útiles en una oblea de 4 pulgadas (Fig. 4.6).

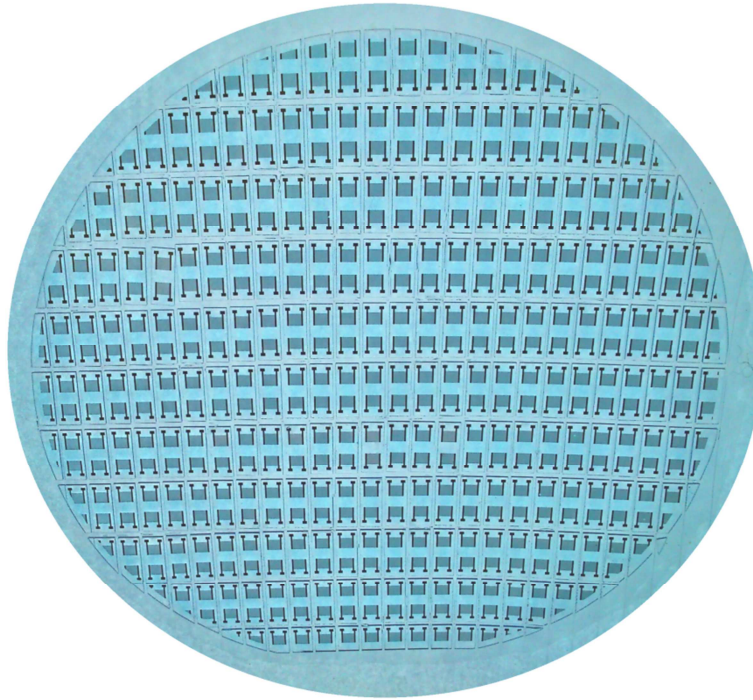


Figura 4.6. Oblea de cuarzo de diámetro 4 pulgadas, con dispositivos RSAW de 9 mm x 4 mm.

La respuesta en frecuencia de los dispositivos RSAW se caracteriza mediante el analizador de redes, obteniéndose una amplitud de -16.2 dB para una frecuencia de 157.2 MHz, y una fase que se aproxima a la linealidad dentro del lóbulo principal de la amplitud (Fig. 4.7). Los picos que se han señalado como 1 y 2 en la Figura 4.7 son debidos a las interferencias producidas. Es sabido que en cada uno de los bordes de los electrodos del RSAW se produce una reflexión, y debido al elevado número de electrodos y a su disposición con una periodicidad $\lambda/2$, todas las reflexiones se suman para algunas frecuencias (interferencia totalmente constructiva). Este fenómeno se denominada eco de triple tránsito (triple transit echo, TTE) [9], y provoca una perturbación de la onda de interés. Se denomina de esta forma porque la onda se propaga desde el IDT que se generó hasta el IDT receptor, pero parte de esta onda se refleja hacia el IDT generador, donde vuelve a ser reflejada y finalmente detectada por el IDT receptor. De esta manera la distancia L_{cc} se recorre tres veces. A pesar de que las fases dentro del lóbulo principal se aproximan a una pendiente única, las diferentes desviaciones que se pueden encontrar también se deben a esta interferencia.

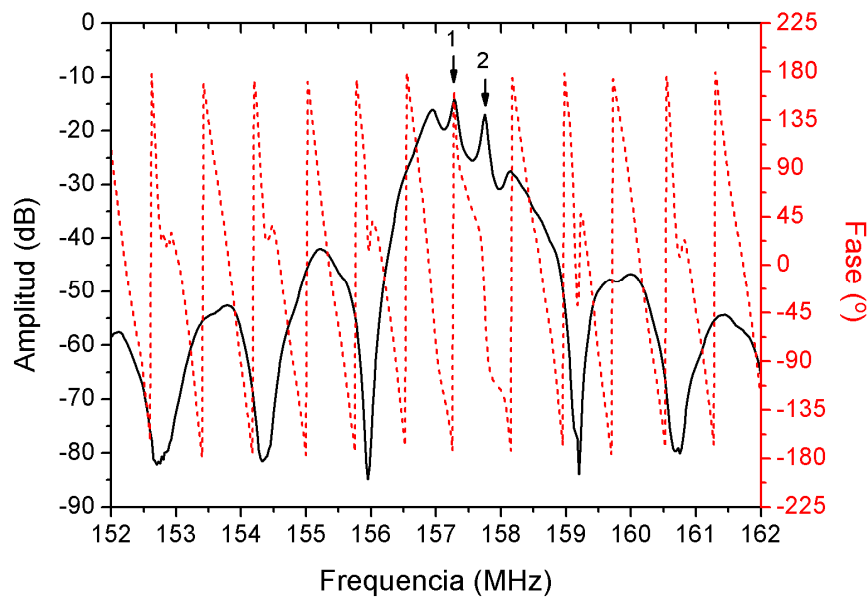


Figura 4.7. Respuesta en frecuencia de la amplitud y la fase de un dispositivo RSAW desarrollado.

4.3.2. Dispositivos másicos basados en ondas Love

En el apartado 3.3.5 se ha explicado que una onda Love se consigue mediante la propagación de una onda SH-SAW en un material piezoeléctrico y además esta onda debe ser guiada por una capa de otro material, esta capa se denomina capa guía (Fig. 4.8). El material de la capa guía tiene que cumplir el requisito de que las ondas SH se propaguen en él a menor velocidad que en el sustrato. La capa guía será de extrema importancia porque sus características determinan la sensibilidad del dispositivo. Para dispositivos cuyo sustrato piezoeléctrico es cuarzo con el corte ST y la onda se propaga perpendicular a la dirección x , el óxido de silicio (SiO_2) amorfo satisface la anterior condición de velocidad de propagación de ondas SH para que exista una onda Love. Además tiene excelentes propiedades elásticas y térmicas, es muy resistente al agua y a la degradación por disolventes orgánicos y abrasivos. Hay que resaltar, que para el caso de los polímeros, como Novolac, la velocidad de propagación de las ondas SH es mucho más baja que en el SiO_2 , lo que hace que estos materiales sean muy buenos candidatos como capas guías, debido a que la sensibilidad que pueden proporcionar a estos dispositivos puede ser mucho mayor que con el SiO_2 . Por esto se han utilizado dos

tipos de capas gu3as (SiO_2 y Novolac) con la finalidad de estudiar sus ventajas y desventajas.

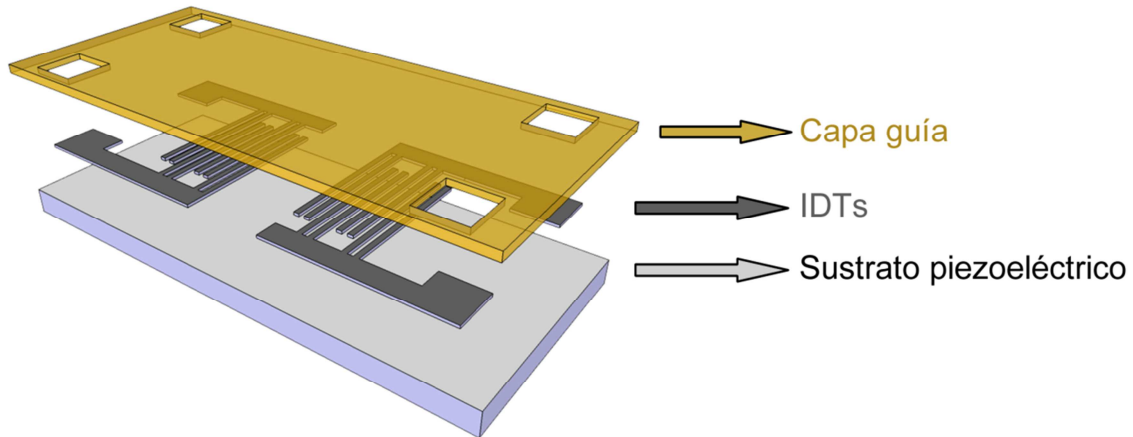


Figura 4.8. Esquema de las diferentes capas de un dispositivo Love.

4.3.2.1. Dispositivos con capa gu3a de SiO_2

4.3.2.1.1. Dep3sito de SiO_2

Para obtener la capa gu3a de SiO_2 se ha utilizado la t3cnica de dep3sito qu3mico en fase vapor asistido por plasma (“plasma enhanced chemical vapor deposition” o PECVD). El sistema de dep3sito (Applied Materials P5000) ha operado a una temperatura de 400 $^{\circ}\text{C}$, e introduce vapores de tetraetil ortosilicato (TEOS) y O_2 , ambos con un flujo de 500 sccm.

4.3.2.1.2. C3lculo del espesor 3ptimo de la capa gu3a de SiO_2

En el caso de dispositivos Love el dise1o es mas complicado que en el de los RSAW, ya que la frecuencia de trabajo y la sensibilidad depender3n no solo de la configuraci3n de los IDTs y de la direcci3n de propagaci3n del material piezoel3ctrico, sino tambi3n del tipo de material de la capa gu3a y su espesor. Para calcular el espesor 3ptimo de la capa gu3a una primera resoluci3n num3rica de la ecuaci3n de dispersi3n 3-37 se ha llevado a

cabo, determinando la frecuencia síncrona para diferentes espesores de capa guía (Fig. 4.9).

Además se han empleado dos aproximaciones diferentes para el cálculo de la sensibilidad, aplicadas a la ecuación general de la sensibilidad para el depósito de una capa de espesor muy pequeño [10]:

$$S_m^f = \frac{\Delta f}{f_0} \frac{1}{\rho \cdot h} \quad (4-1)$$

siendo Δf el desplazamiento de la frecuencia de resonancia, f_0 la frecuencia de resonancia, ρ la densidad del material, y h el espesor de la capa depositada.

Primero se ha hecho la suposición de que una capa muy delgada del mismo material que la capa guía se deposita sobre un espesor determinado de esta capa, sin tener en cuenta el cambio de sensibilidad debido a este incremento de espesor. Por tanto si a partir de la frecuencia de resonancia obtenida para los diferentes espesores de la capa guía se calcula la sensibilidad para un cambio infinitesimal del espesor, la ecuación 4-1 se expresa como:

$$S_m^f = \frac{1}{\rho_h \cdot f_0} \cdot \frac{\partial f}{\partial h} \quad (4-2)$$

siendo ρ_h la densidad de la capa guía.

Una segunda aproximación más elaborada para el cálculo de la sensibilidad fue realizada por Z. Wang, considerando una tercera capa de espesor muy pequeño [11,12]. Así la relación entre el espesor y la sensibilidad sería:

$$S_m^f = \frac{1}{\rho_h \lambda} \left[\frac{h}{\lambda} \left(1 + \frac{\cos(\beta_h h) \cdot \sin(\beta_h h)}{\beta_h h} + \frac{\rho_s / \rho_h}{\beta_s h} \cos^2(\beta_h h) \right) \right]^{-1} \quad (4-3)$$

$$\beta_h = \sqrt{\frac{\omega^2}{v_h^2} - \frac{\omega^2}{v^2}} \quad (4-4)$$

$$\beta_s = \sqrt{\frac{\omega^2}{v^2} - \frac{\omega^2}{v_s^2}} \quad (4-5)$$

siendo, λ , la longitud de onda, h , el espesor de la capa gu3a, ρ_h , la densidad de la capa gu3a, ρ_s , la densidad del sustrato, β_h , la constante de propagaci3n transversal de la capa gu3a, β_s , la constante de propagaci3n transversal del sustrato, V_h , la velocidad de propagaci3n de una onda SH en la capa gu3a, V_s , la velocidad de propagaci3n de una onda SH en el sustrato, y ω la velocidad angular.

Ambas aproximaciones de la sensibilidad se han usado para calcular el espesor 3ptimo de la capa gu3a de SiO₂ (Fig. 4.9) de un dispositivo con $\lambda=28\text{ }\mu\text{m}$.

La velocidad de propagaci3n de una onda SH en el cuarzo se ha calculado mediante la ecuaci3n 3-27, rotando el tensor de los coeficientes de rigidez (Anexo 2) en la direcci3n que se propaga la onda, correspondiente a los 3ngulos de Euler (0, 132.75, 90), obteni3ndose un valor de $4973\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Las caracter3sticas del SiO₂ depositado por PECVD han sido tomadas del MIT [13], son: $\rho_h = 2300\text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $\mu_h = 25.5\cdot 10^9\text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$, y por tanto a partir de la ecuaci3n 3-28 se obtiene que la velocidad es $V_h = 3330\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

La velocidad de las ondas Love para capas gu3as delgadas es algo mayor que la de las ondas SH-SAW en el sustrato, y para espesores de dichas capas pr3ximos al valor de la λ , la velocidad de propagaci3n se aproxima asint3ticamente a la velocidad de las ondas SH en el material de la capa gu3a. Por tanto en la Figura 4.9 vemos como la frecuencia decrece seg3n aumenta el espesor de la capa gu3a.

El espesor 3ptimo de la capa gu3a obtenido por ambas aproximaciones se encuentra entre $4\text{ }\mu\text{m}$ y $6\text{ }\mu\text{m}$, ver Figura 4.9.

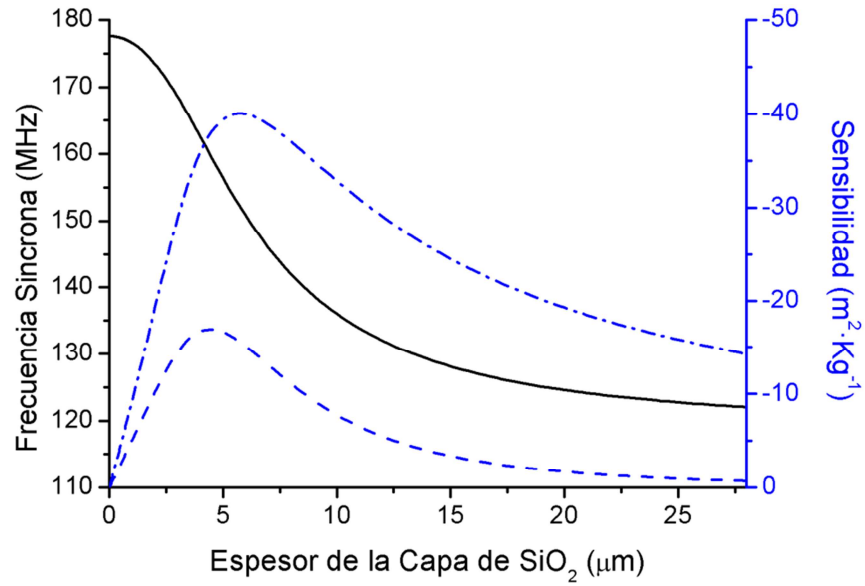


Figura 4.9. Frecuencia síncrona (-) y sensibilidad: obtenidas para diferentes espesores de la capa guía de SiO₂. (- · - · -) según Wang y (- - -) derivada con respecto al espesor.

4.3.2.1.3. Diseño de los dispositivos con capa guía de SiO₂

Teniendo en cuenta que los valores del espesor óptimo obtenidos teóricamente se encuentran aproximadamente entre 4 μm y 6 μm, y que la amplitud de la onda decae con el espesor de la capa guía, se ha elegido un espesor inicial de la capa de SiO₂ igual a 3.5 μm. Con este espesor de capa guía y los parámetros indicados en la Tabla 4.1, se han fabricado los dispositivos (con simple y doble electrodo) según la configuración de la Figura 4.10.

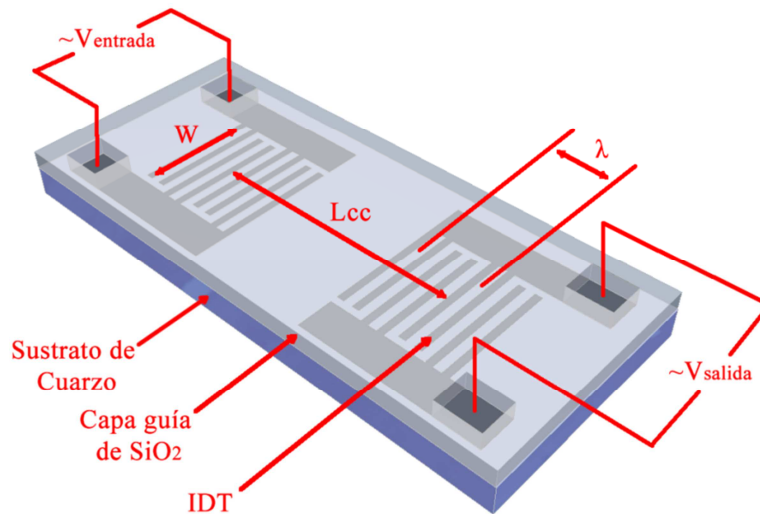


Figura 4.10. Esquema de un dispositivo Love (doble electrodo).

Tabla 4.1. Parámetros de los diferentes dispositivos diseñados y fabricados.

Diseño	$W(\lambda)$	$L_{cc}(\lambda)$	N
Q1	75	135	60
Q2	60	150	75
Q3	75	150	75
Q4	60	135	60
Q5	50	221.2	60
Q6	60	201.2	60
Q7	50	236.2	75
Q8	60	216.2	75
Q9*	75	100	25
Q10*	75	125	50
Q11*	75	150	75
Q12*	75	175	100

* Significa que el IDT incorpora tecnología de doble electrodo

En un primer proceso de fabricación, se realizó una configuración de electrodo simple (Q1-Q8), que quiere decir que los electrodos de cada polaridad son alternos. Pero a diferencia de los dispositivos RSAW, en este caso el fenómeno TTE perturba fuertemente la respuesta en frecuencia de estos dispositivos, haciéndolos inoperables como sensores, debido al fuerte rizado de la amplitud (como ejemplo se han numerado del 1 al 6 los picos debidos al TTE en la Figura 4.11), y a las perturbaciones en la fase, que hacen que no se aproxime a una pendiente única. Por tanto si este dispositivo fuese utilizado como oscilador tendría una gran inestabilidad e incluso se podría dar el caso de saltos entre fases $2\pi n$, siendo $n=1,2,3,\dots$, es decir, saltos entre varias frecuencias de trabajo.

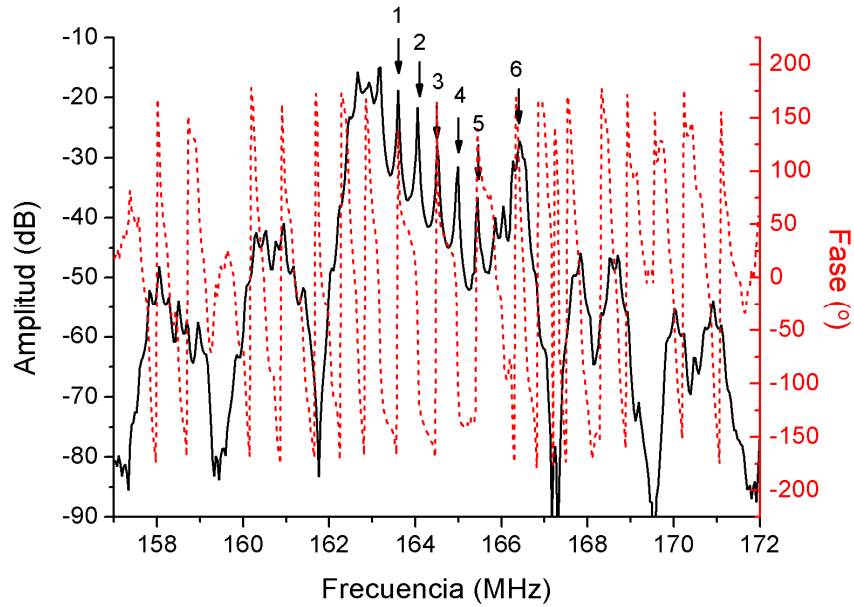


Figura 4.11. Respuesta en frecuencia del dispositivo Q6. Se han marcado con números algunos de los picos debidos al fenómeno TTE.

La solución más utilizada es desdoblar cada electrodo en dos, para que la periodicidad con la que se repiten los electrodos (sin tener en cuenta su polaridad) en lugar de ser $\lambda/2$ sea $\lambda/4$ (Fig. 4.12), de modo que la interferencia entre reflexiones sea totalmente destructiva, eliminando el TTE [14,15], y la onda generada tenga la misma frecuencia.

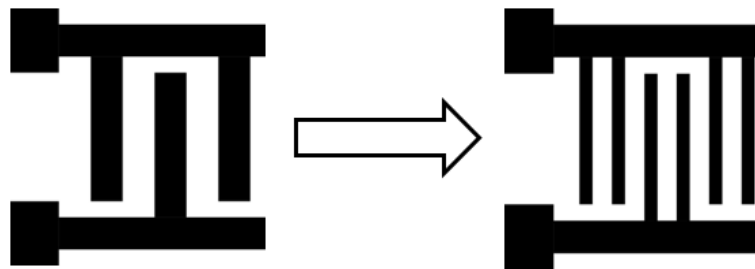


Figura 4.12. Paso de la configuración de un IDT de electrodo simple a una de electrodo doble.

Debido a la importancia de la capa guía en los dispositivos Love, esta se sometió a una caracterización morfológica mediante un perfilómetro de contacto. El SiO_2 depositado por PECVD ha mostrado buenas propiedades con respecto a porosidad y rugosidad, pero su superficie reproduce la topografía sobre la que se deposita, es decir, es conforme con la superficie de los electrodos, dando lugar a una superficie escalonada de la capa de SiO_2 , tal y como muestra la Figura 4.13.



Figura 4.13. Esquema del perfil del dispositivo Love cuando se deposita SiO₂ mediante la técnica de PECVD sobre los electrodos.

En este caso el fenómeno de TTE es diferente al que se produce en los RSAW, ya que el efecto de reflexión en la interfase escalonada SiO₂-aire, resulta ser de mucha mayor importancia que en la interfase escalonada SiO₂-aluminio o aluminio-cuarzo. Y para comprobar esto, un dispositivo Love con simple dedo, Q6, se sometió a un ligero pulido, rebajando así los escalones hasta conseguir formas menos abruptas (Fig. 4.14).

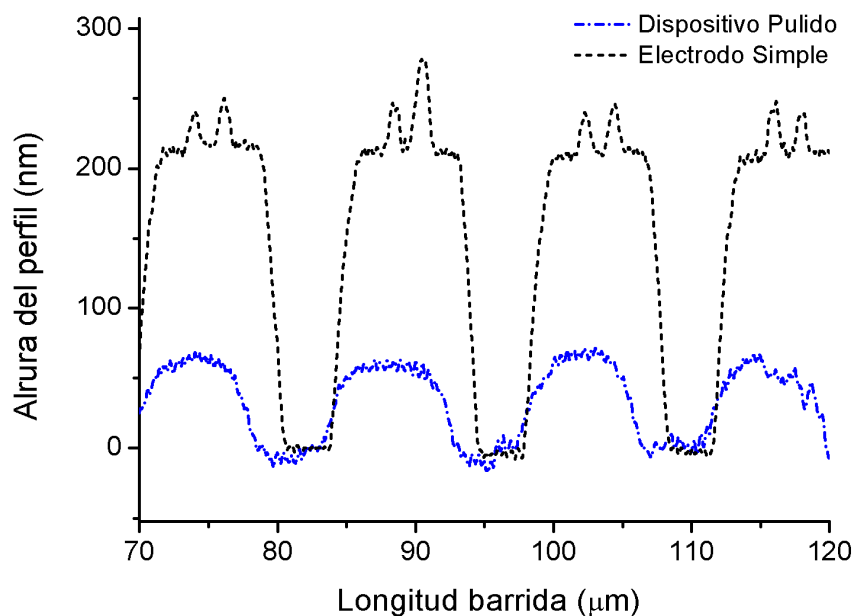


Figura 4.14. Perfil de los escalones de la capa de SiO₂ al ser depositada sobre los IDTs, los cuales han sido medidos con el perfilómetro antes y después del proceso de pulido.

Hay una notable diferencia tanto en la altura como en la forma de los escalones del SiO_2 antes y después de ser pulido. Esto tiene grandes consecuencias en la respuesta en frecuencia, tal y como se muestra en las Figuras 4.15 y 4.16.

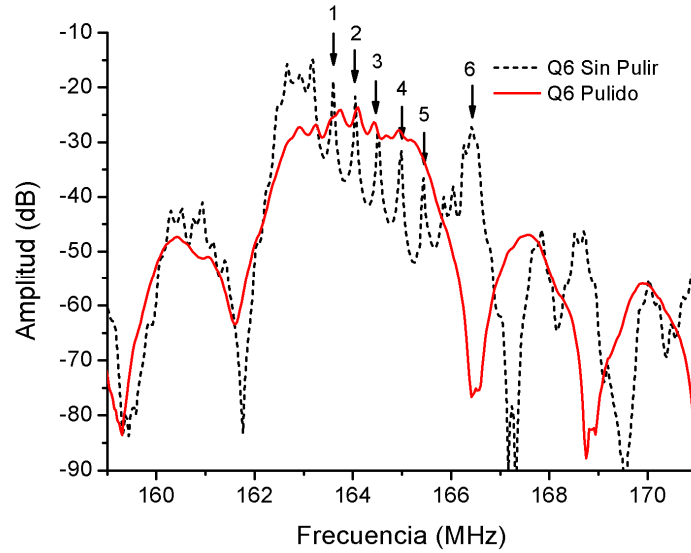


Figura 4.15. Diferencia de la respuesta en frecuencia para la amplitud en un dispositivo Q6 antes y después de ser pulido.

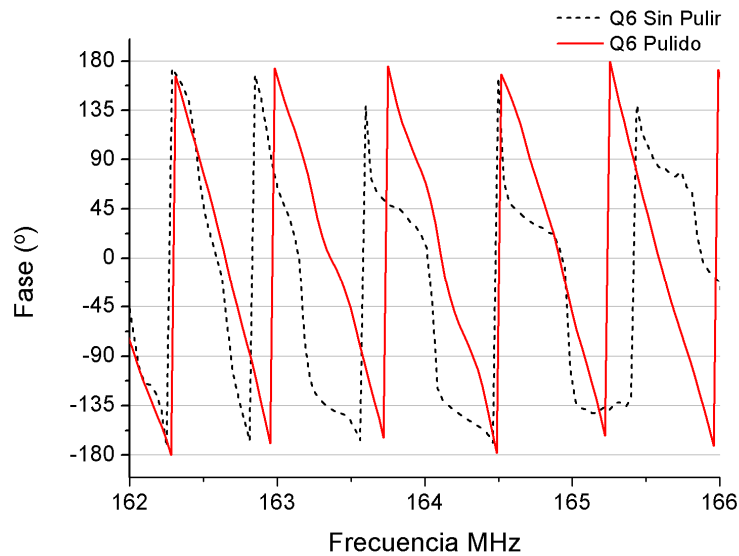


Figura 4.16. Diferencia de la respuesta en frecuencia para la fase en un dispositivo Q6 antes y después de ser pulido.

Se observa la eliminación del TTE debido a la nueva morfología de la superficie del SiO_2 , pasando de una respuesta en frecuencia donde la amplitud tiene un prominente rizado y la fase no responde a ninguna linealidad, a una respuesta en la cual el rizado de

la ganancia esta suavizado casi por completo y la fase se aproxima a tener una pendiente 3nica. Esta 3ltima es el tipo de se3al que se necesita para poder obtener un dispositivo que se pueda utilizar como un sistema oscilador estable y por tanto como un buen sensor. En conclusi3n se puede decir que la eliminaci3n parcial de los escalones ha conllevado a una eliminaci3n del fen3meno TTE. Por tanto es posible obtener un dispositivo Love de caracter3sticas apropiadas para ser utilizado como sensor. De esta forma se ha demostrado que la perturbaci3n debida al fen3meno de TTE en los dispositivos de ondas Love, se debe a los escalones abruptos en la interfase SiO₂-aire, es decir, en la superficie libre.

La resoluci3n del sistema fotolitogr3fico suele ser una limitaci3n cuando queremos trabajar a frecuencias m3s altas. Por esta raz3n una novedad en este tipo de sensores es que el simple dedo se podr3a utilizar si se tuviera la tecnolog3a necesaria para eliminar los escalones, aunque ser3a necesario incorporar un proceso de pulido en la fabricaci3n de los dispositivos.

Debido a que la resoluci3n del sistema fotolitogr3fico permite pasar a configuraci3n de doble electrodo manteniendo la frecuencia, se ha seguido esta v3a para el desarrollo de los dispositivos. En la Figura 4.17 se puede ver la diferencia entre los escalones de simple y doble electrodo, con una periodicidad de $\lambda/2=14\text{ }\mu\text{m}$ para el simple electrodo y $\lambda/4=7\text{ }\mu\text{m}$ para el doble electrodo. El resultado final del dispositivo de doble electrodo se muestra en la Figura 4.18.

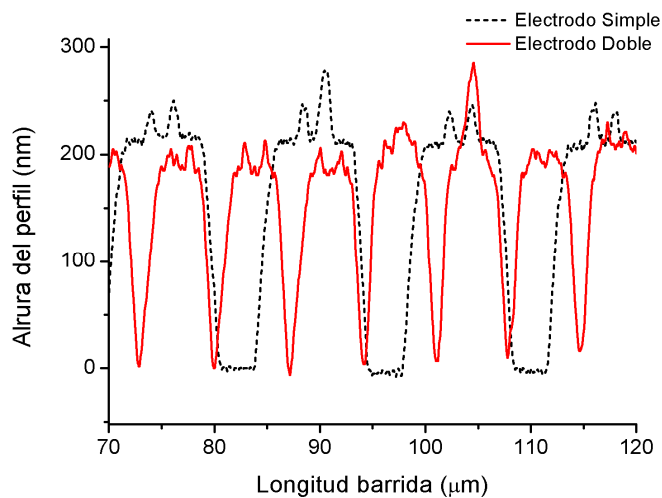


Figura 4.17. Perfil de SiO₂ depositado sobre los IDTs para las configuraciones de simple y doble electrodo.

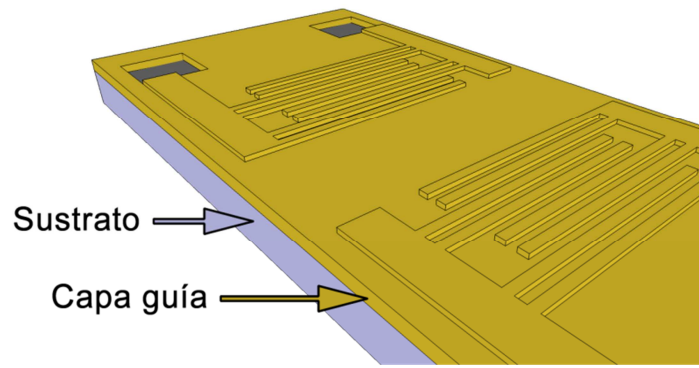


Figura 4.18. Representación de la conformidad de la capa guía de SiO₂ al ser depositado sobre los IDTs.

Al igual que en el caso del dispositivo pulido los dispositivos de doble electrodo muestran una respuesta en frecuencias sin un rizado abrupto para la amplitud, y una fase que se aproxima a la linealidad (Fig. 4.19 y 4.20). En el caso del dispositivo de doble electrodo se pueden advertir tres picos en la respuesta en frecuencia para la amplitud, estos corresponden a la reflexión de la onda en los bordes del dispositivo y no al TTE, ya que aunque el dispositivo se ha recubierto de silicona en los extremos, debido a la poca distancia que hay entre el IDT y el borde, la onda no se amortigua por completo. En este caso no supone un problema puesto que la respuesta en fase sigue siendo suficientemente lineal y permite tener un buen dispositivo para ser utilizado como sensor.

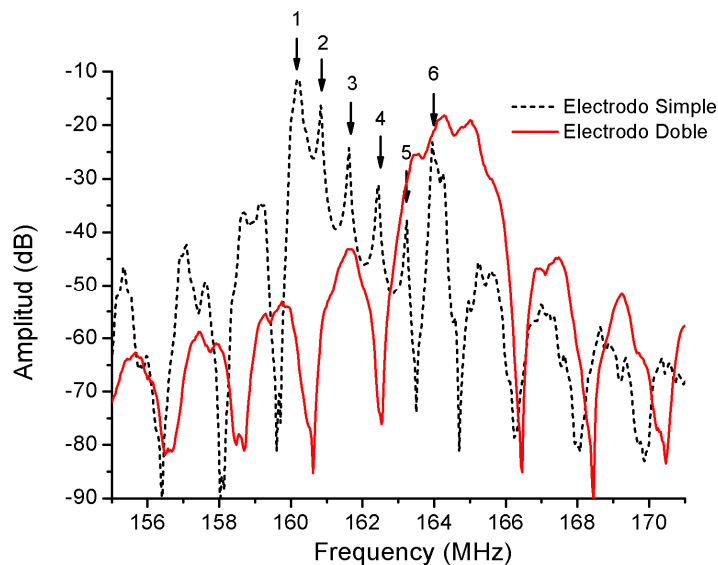


Figura 4.19. Diferencia de la respuesta en frecuencia para la amplitud en un dispositivo Q6 (simple electrodo) y en un dispositivo Q11 (doble electrodo).

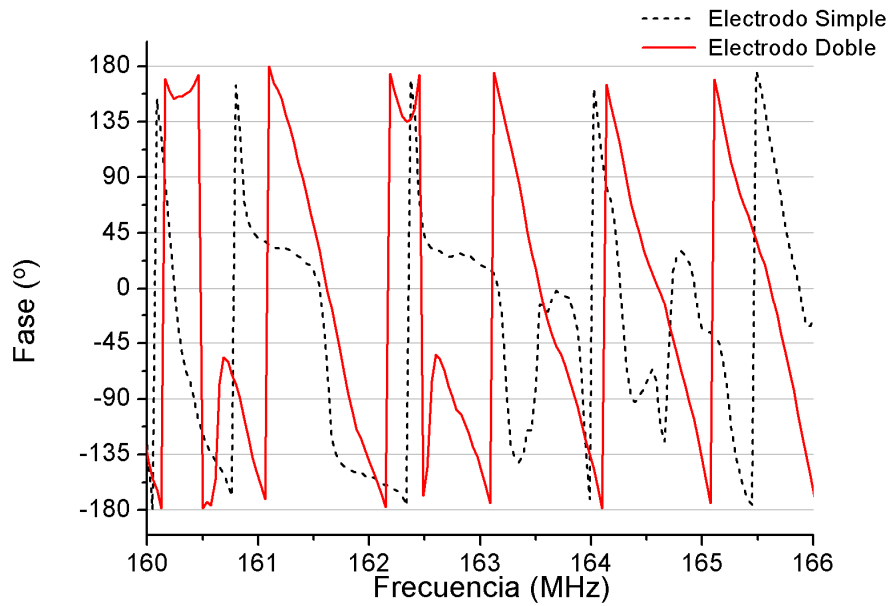


Figura 4.20. Diferencia de la respuesta en frecuencia para la fase en un dispositivo Q6 (simple electrodo) y en un dispositivo Q11 (doble electrodo).

Al principio de este capítulo se comentó que la configuración para los dispositivos utilizados en este trabajo es el de una línea de retardo. En la Figura 4.21 se presenta la medida en el dominio temporal, donde la mayor densidad de energía de la onda, desde que se genera en un IDT hasta que se recibe por el otro, se observa que llega al cabo de 1 μ s, que es el denominado tiempo de retardo. Además se ve como ese pico es mucho mayor que los otros que aparecen: el primer pico por la izquierda es una señal electromagnética cuyo tiempo de retardo es $\sim 10^{-11}$ s, y los demás son señales acústicas debido a las reflexiones en los bordes. Por otra parte, en esta figura también es posible observar que en la configuración de simple electrodo no hay un tiempo característico para el cuál se obtiene la mayor densidad de energía de la onda, y por tanto no muestra el principal parámetro de una línea de retardo. Las amplitud de las señales espurias (electromagnética y reflejadas) son inferiores en ~ 30 dB a la acústica principal, por lo que su contribución a la señal principal es mínima.

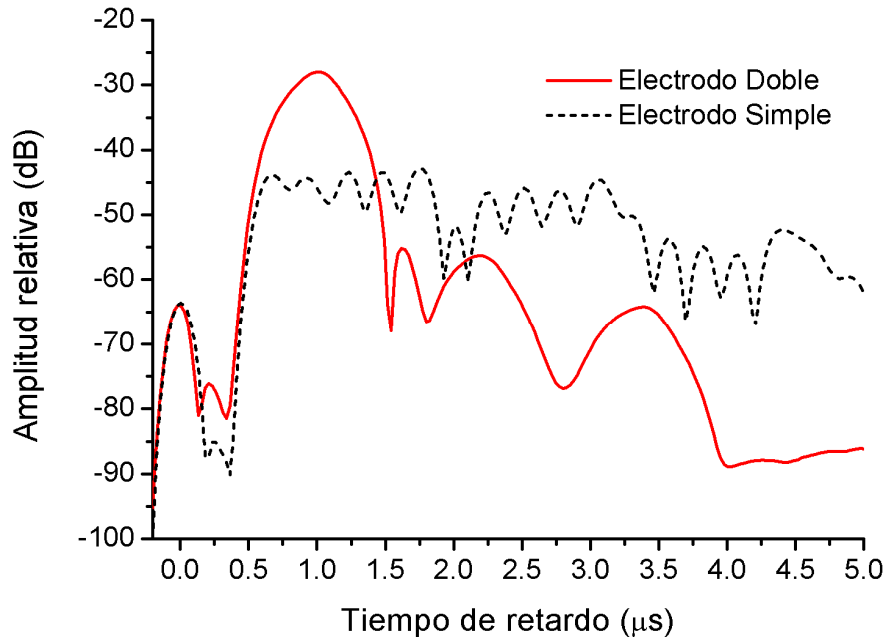


Figura 4.21. Amplitud relativa al tiempo de retardo del dispositivo Q6 (simple electrodo) y Q11 (doble electrodo).

El número de electrodos de cada IDT influye directamente tanto en la anchura del lóbulo principal como en la amplitud (anchura de banda). Por esta razón se realizaron diseños con diferentes números de electrodos (Q9-Q12) en cada IDT y se ha estudiado su respuesta en frecuencia (Fig. 4.22, 4.23, 4.24 y 4.25) para de este modo obtener un dispositivo optimizado.

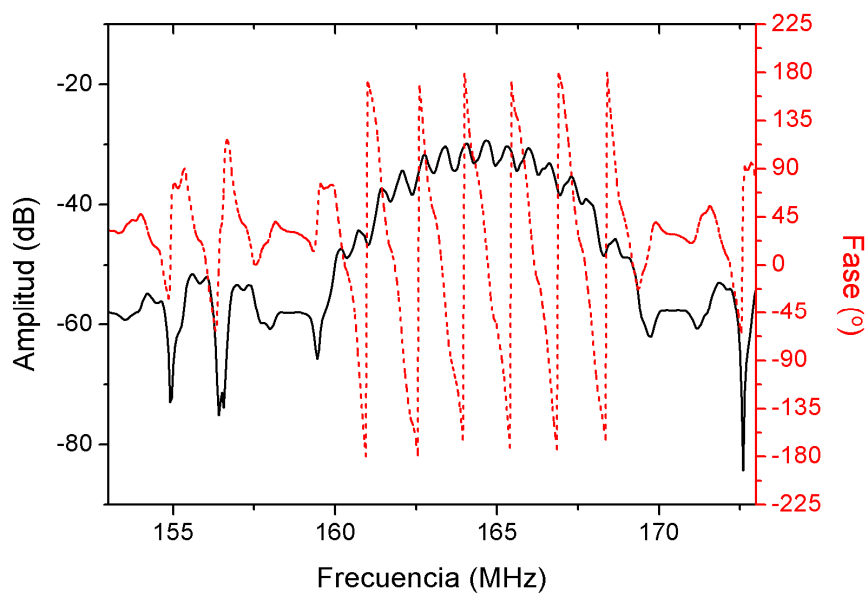


Figura 4.22. Respuesta en frecuencia del dispositivo Q9 ($N=25$) para la amplitud y la fase.

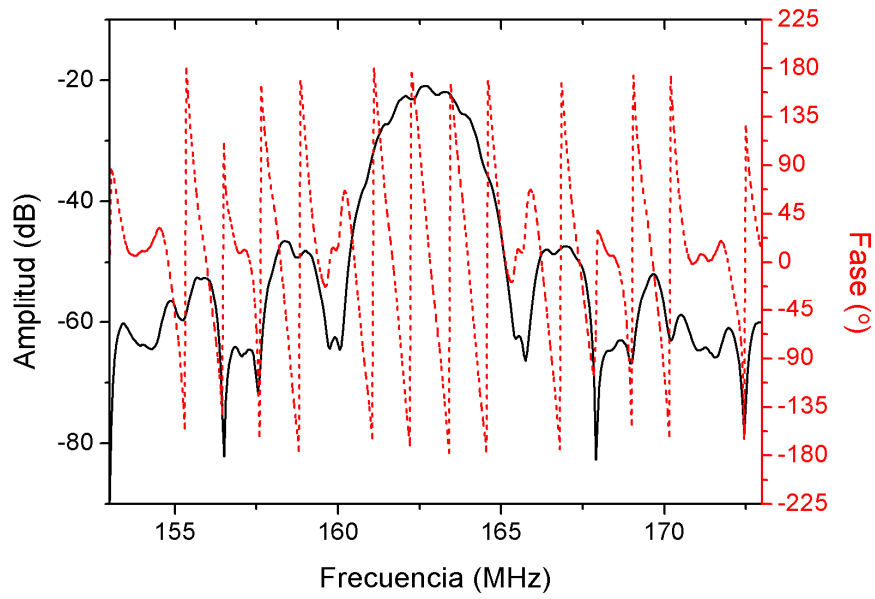


Figura 4.23. Respuesta en frecuencia del dispositivo Q10 ($N=50$) para la amplitud y la fase.

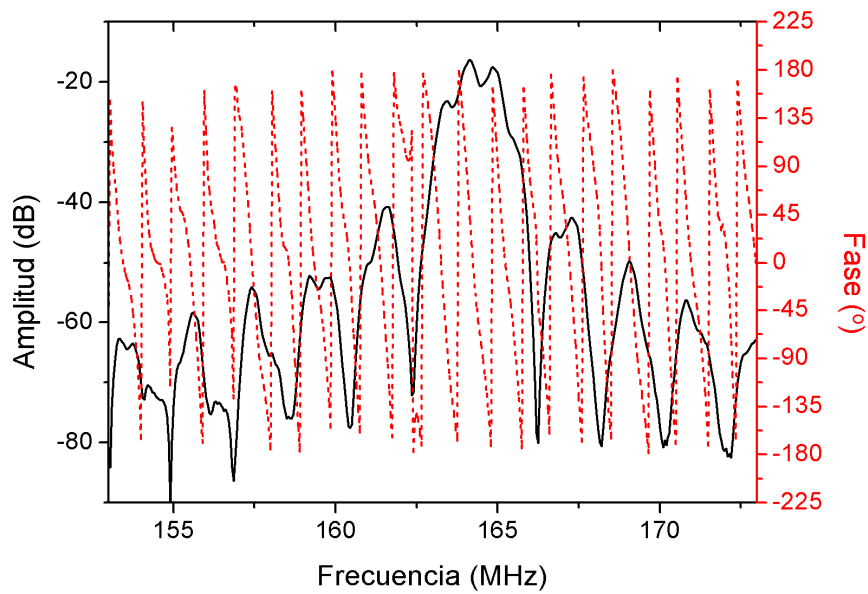


Figura 4.24. Respuesta en frecuencia del dispositivo Q11 ($N=75$) para la amplitud y la fase.

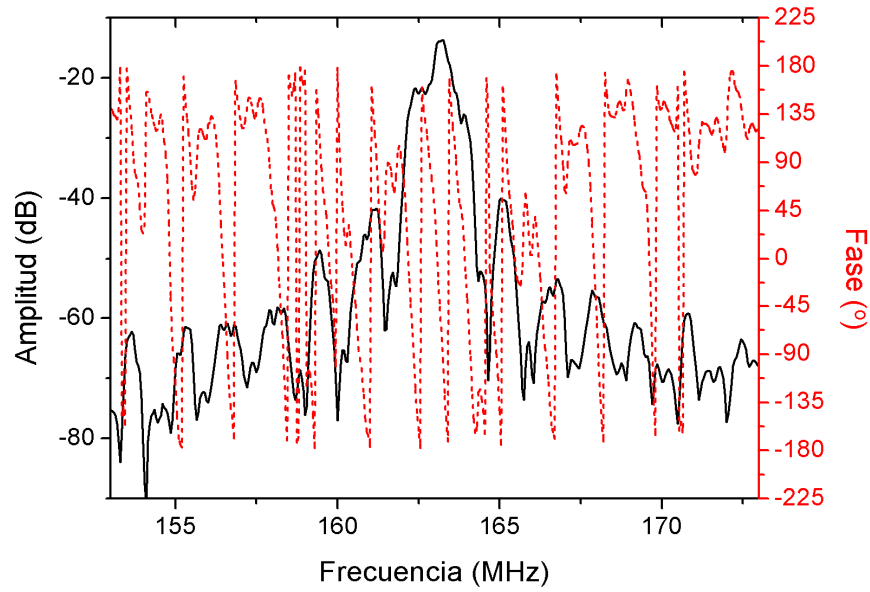


Figura 4.25. Respuesta en frecuencia del dispositivo Q12 ($N=100$) para la amplitud y la fase.

El dispositivo seleccionado ha sido el Q11 debido a que la amplitud máxima es bastante mayor que para Q9 y Q10, y similar a la del Q12 (Fig. 4.26). Además hay que tener en cuenta que a mayor número de electrodos más estrecho es el lóbulo principal, o mayor es el factor de calidad si se ve como un filtro. Por tanto la variación de amplitud en un ciclo será mayor.

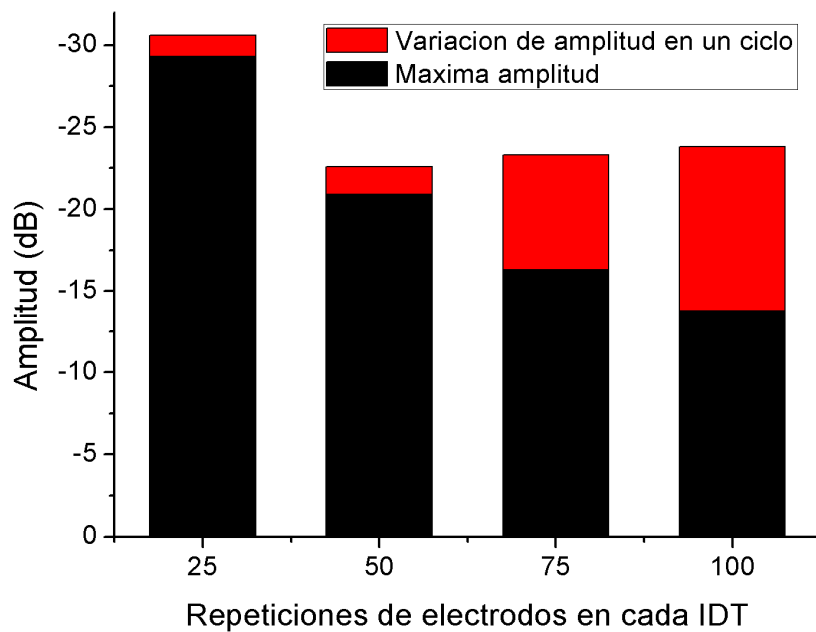


Figura 4.26. Amplitudes m3ximas para los diferentes dise1os: Q9 ($N=25$), Q10 ($N=50$), Q11 ($N=75$) y Q12 ($N=100$).

Una vez seleccionado el dise1o 3ptimo, se depositaron diferentes espesores de SiO_2 , para estudiar la relaci3n entre la m3xima amplitud y la frecuencia s3ncrona, y de esta forma compararlos con los resultados te3ricos obtenidos en el apartado 4.3.2.1.2. Esto nos ha permitido ajustar los resultados te3ricos a los obtenidos experimentalmente mediante los par3metros de la capa gu3a (Fig. 4.27), puesto que la capa de SiO_2 puede cambiar sus propiedades seg3n los par3metros elegidos en el proceso de dep3sito por PECVD (gases reactivos, temperaturas de operaci3n, etc).

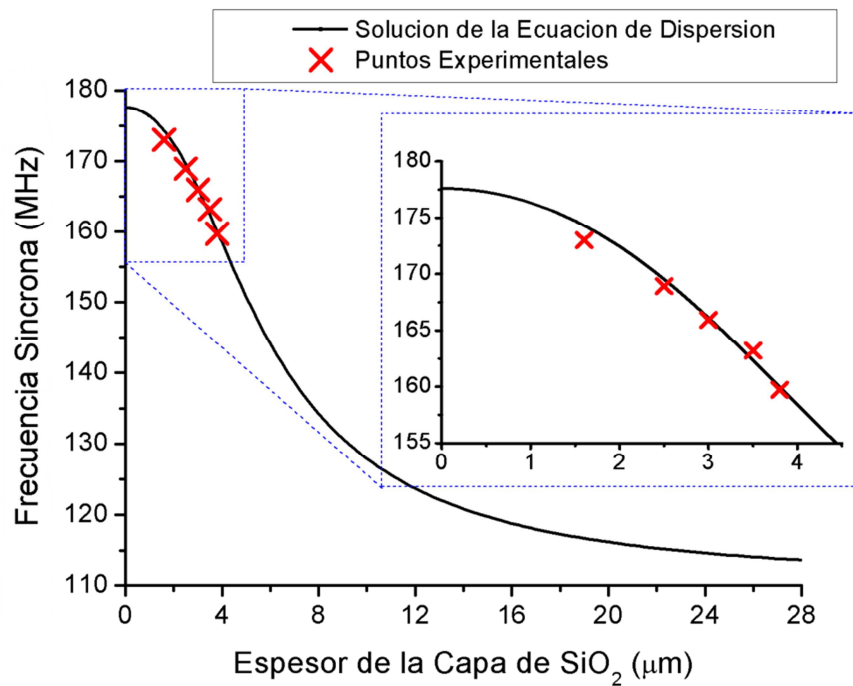


Figura 4.27. Frecuencia s3ncrona para diferentes espesores experimentales de SiO_2 .

Concluyendo los par3metros finales obtenidos para la capa SiO_2 son muy parecidos a los referenciados por el MIT, con alguna peque1a variaci3n, debido a que el proceso de PECVD no se ha hecho en las mismas condiciones. Los valores han sido: $\rho_h = 2300 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $\mu_h = 22.1 \cdot 10^9 \text{ N}\cdot\text{m}^{-3}$, y la velocidad es $V_h = 3100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para los dispositivos estudiados la amplitud de la onda decae con el espesor de la capa gu3a (Fig. 4.28), siendo la amortiguaci3n muy pronunciada a partir de $3.5 \mu\text{m}$.

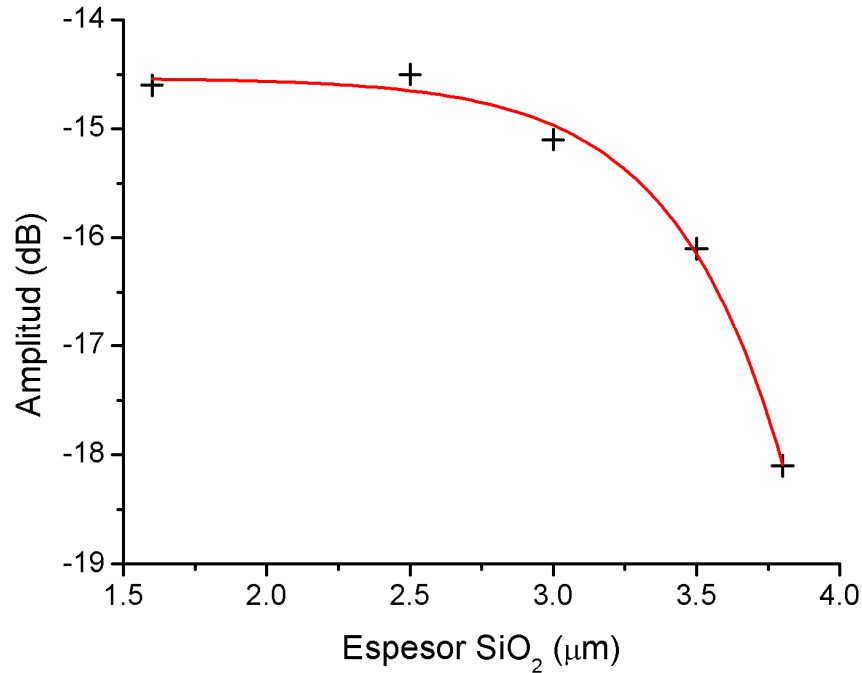


Figura 4.28. Amplitud máxima para diferentes espesores experimentales de SiO₂.

Finalmente, con los datos obtenidos para la capa de SiO₂, se ha recalculado la sensibilidad en relación con el espesor de la capa guía mediante las ecuaciones 4-2 y 4-3, obteniéndose valores máximos de $-21.7 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-2}$ para 4.25 μm y $-45.2 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-2}$ para 5.25 μm respectivamente. Además a partir de la ecuación 4-1 se ha calculado la sensibilidad utilizando los valores de frecuencia síncrona experimentales y los diferentes espesores depositados de la capa de SiO₂, siendo en este caso, h , la diferencia de espesor entre dos capas guías, resultando un valor máximo de $-31.2 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-2}$ para 3.65 μm (Fig 4.29).

Como se ha comentado anteriormente la amplitud decae fuertemente a partir de un espesor de 3.5 μm . Para el caso de la sensibilidad calculada según Z. Wang se obtiene a un espesor de 3.5 μm una sensibilidad igual al 87% de la sensibilidad máxima, y según la derivada de la frecuencia un 96 % (Fig. 4.29). Por tanto estos resultados son lo suficientemente buenos para mantener la amplitud, fijando como valor óptimo un espesor de la capa guía de SiO₂ igual a 3.5 μm .

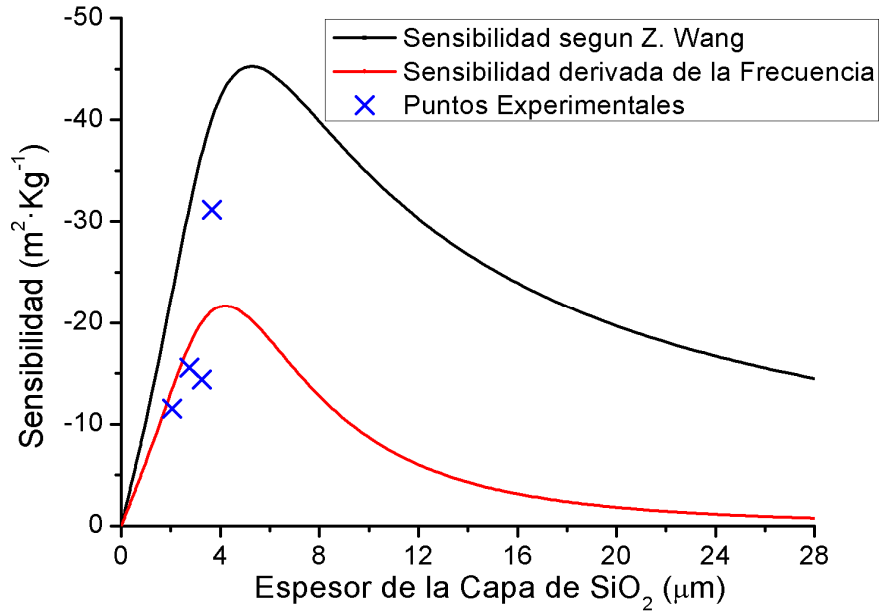


Figura 4.29. Sensibilidades calculadas para el dispositivo con capa guía de SiO₂.

4.3.2.2. Dispositivos con capa guía de Novolac

La velocidad de propagación de las ondas SH en polímeros [16-20] es mucho más pequeña que en materiales del tipo del SiO₂, y esto puede proporcionar una alta sensibilidad a los dispositivos. Por esta razón se ha usado un polímero denominado Novolac [20] como capa guía. Además de la sensibilidad que pueda aportar el Novolac al sensor, se ha elegido este polímero por su gran estabilidad ante disolventes y agentes químicos, con los que están en contacto los dispositivos. Este polímero está disponible comercialmente en forma de fotorresina. Al depositar la capa guía los contactos de los IDTs quedan enterrados, y mediante un proceso fotolitográfico se eliminará la fotorresina de dichos contactos en el proceso de revelado.

4.3.2.2.1. Calculo del espesor óptimo de la capa guía de Novolac

De la misma forma que en el caso de la capa guía de SiO₂ se ha realizado un estudio previo para obtener el espesor óptimo de la capa guía de Novolac (Fig 4.30), utilizando las ecuaciones 4-2 y 4-3. En este caso se han utilizado los datos del polímero

polimetilmetacrilato (PMMA) obtenidos del MIT [21], porque no hay referencia sobre Novolac, y estos son: $\rho_h = 1200 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $\mu_h = 2.944 \cdot 10^9 \text{ N}\cdot\text{m}^{-3}$, y $V_h = 1576 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

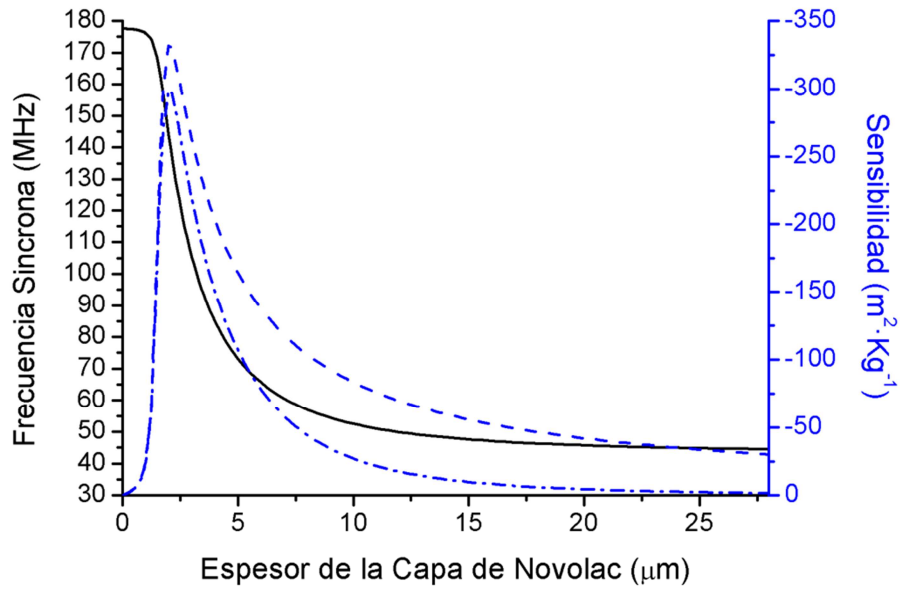


Figura 4.30. Frecuencia sincrona (-) y sensibilidad: obtenidas para diferentes espesores de la capa guía de Novolac. (- · - · -) según Wang y (- - -) derivada con respecto al espesor.

En la Figura 4.30 se observa que el espesor óptimo en relación con la sensibilidad se encuentra aproximadamente en $2.5 \mu\text{m}$.

4.3.2.2.2. Depósito de Novolac

Los sustratos piezoeléctricos con los IDTs ya depositados se han sumergido primero en acetona y después en alcohol isopropílico para limpiarlos antes del depósito de la fotorresina con base Novolac, que actúa como capa guía (Fig. 4.31). Diferentes disoluciones de la fotorresina negativa (AZ[®] nLOFTM 2070) y el disolvente PGMEA (AZ[®] EBRTM Solvent) se depositaron utilizando un spinner (Laurell WS-650SZ) a una velocidad de 4200 rpm durante un tiempo de 30 s (aceleración de 2500 rpm/s). En el proceso fotolitográfico se ha utilizado una máscara para evitar la exposición de la fotorresina que se encuentra sobre los contactos y esta se ha eliminado posteriormente disolviéndola con el revelador (AZ 300 MIF Developer). Tres tratamientos térmicos diferentes por contacto directo se realizaron durante el depósito de la capa guía: antes del depósito el dispositivo se mantiene a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 s para la desorción de las moléculas de agua (deshidratación); después del depósito se somete a $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante

60s para la evaporaci3n del disolvente; y por 3ltimo tras la exposici3n a radiaci3n UV y revelado se trata el dispositivo a 150 °C durante un tiempo de 30 min, para una eliminaci3n completa de los restos de disolvente y una polimerizaci3n completa de la fotorresina. Finalmente, los restos de la fotorresina sin polimerizar y el revelador se eliminan mediante una limpieza con alcohol isoprop3lico y agua desionizada.

Una vez completado el proceso de polimerizaci3n de la fotorresina, los dispositivos se introducen durante 24 horas en diversos disolventes org3nicos (acetona, etanol, cloroformo y dimetil acetamida) para comprobar su resistencia a los mismos, con lo que se demostrando una completa estabilidad.

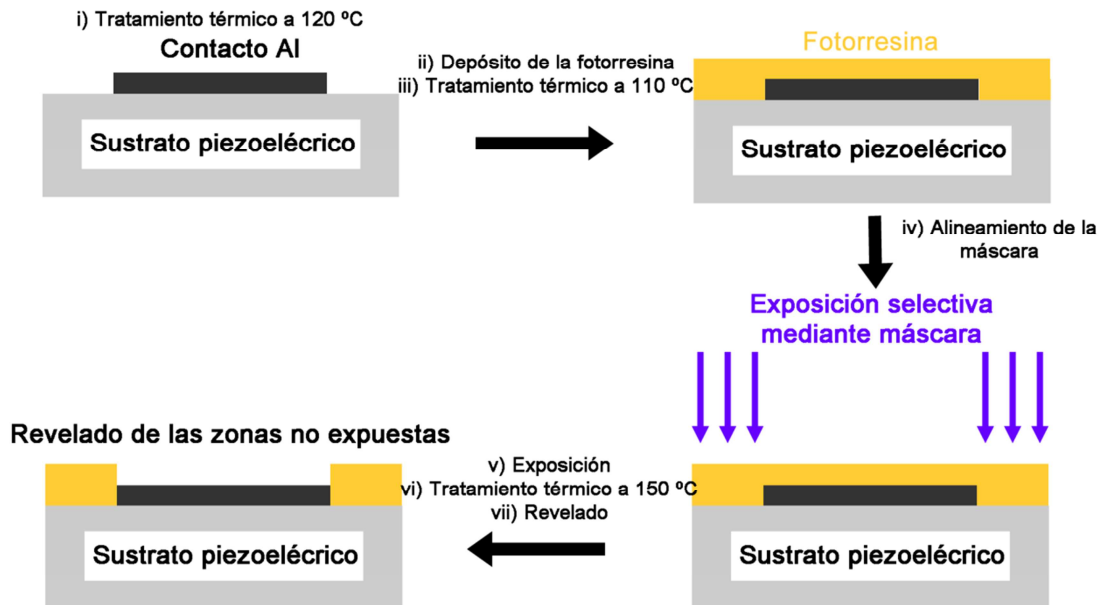


Figura 4.31. Esquema del proceso fotolitogr3fico para el dep3sito de la capa gu3a del dispositivo Love mediante una fotorresina basada en Novolac. El proceso fotolitogr3fico permitir3 liberar los contactos de los IDTs de la fotorresina.

Diferentes espesores de Novolac de: 0.4 μm , 0.5 μm , 0.6 μm , 0.7 μm , 0.8 μm , 1 μm , 1.2 μm , 1.4 μm y 1.6 μm , se prepararon y depositaron como capas gu3as seg3n la curva de la Figura 4.32. Mediante el analizador de redes se ha medido la transmisi3n de cada dispositivo y se ha obtenido la frecuencia s3ncrona para cada espesor.

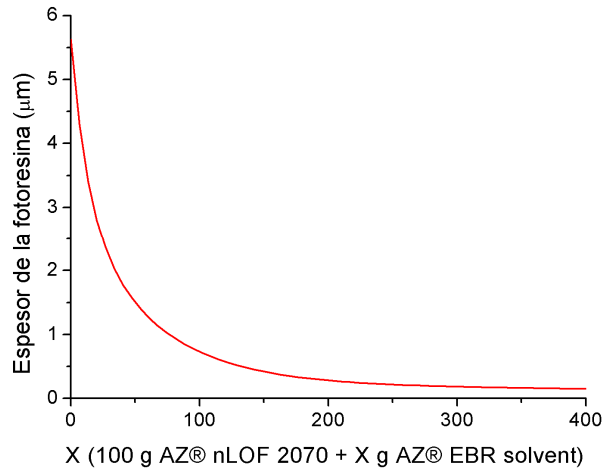


Figura 4.32. Especificaciones del fabricante para obtener un espesor determinado de la fotorresina al depositarla mediante un “spinner” de 4200 rpm y después del tratamiento térmico final en relación con la concentración de fotorresina inicial y disolvente.

Inicialmente se ha realizado la aproximación con las constantes del PMMA para obtener el espesor óptimo. Pero para conocer los valores más apropiados, las soluciones numéricas de la ecuación de dispersión se han ajustado a las medidas experimentales de los dispositivos desarrollados con diferentes espesores de Novolac (Fig 4.33). Resultando de dicha aproximación las constantes para el Novolac son: $\rho_h = 1185 \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $\mu_h = 1.735 \cdot 10^9 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$, y la velocidad es $V_h = 1210 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

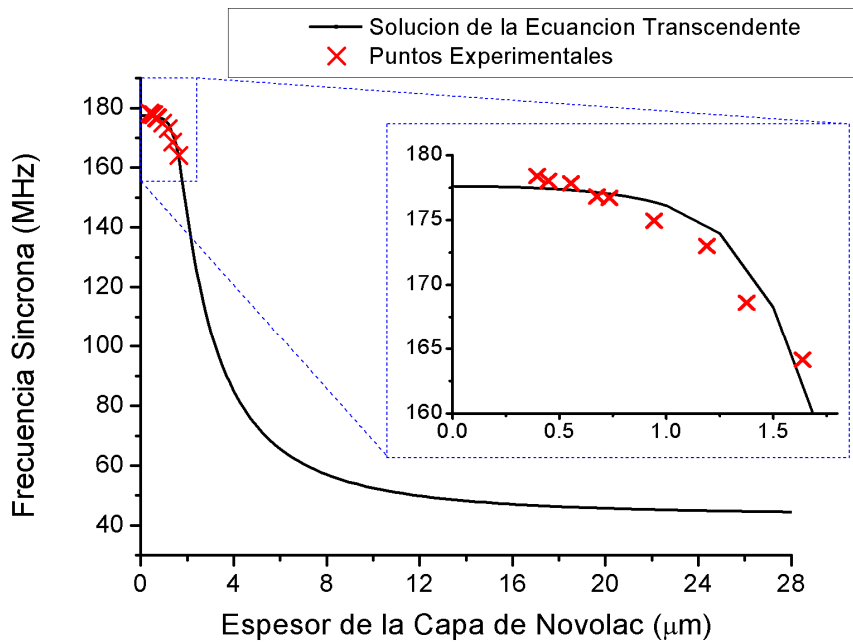


Figura 4.33. Frecuencia síncrona para diferentes espesores de Novolac.

Como ya se ha comentado y se puede ver en los resultados anteriores, los pol3meros como Novolac son muy interesantes desde el punto de vista de la sensibilidad, debido a la baja velocidad de propagaci3n de ondas SH, puesto que la frecuencia en relaci3n con el espesor decrece mucho m3s r3pido para el Novolac que para el SiO₂. Sin embargo, seg3n aumentamos el espesor de la capa gu3a, la amplitud de la onda propagada decrece mucho m3s r3pidamente para el Novolac (Fig. 4.34), debido a la amortiguaci3n que sufren las ondas SH al propagarse en materiales del tipo de los pol3meros. Por esta raz3n, es complicado que el dispositivo Love trabaje con la capa gu3a de espesor 3ptimo cuando la capa gu3a es un pol3mero. Debido a esto se ha elegido para trabajar un dispositivo con una capa gu3a de Novolac de espesor de 0.8 μm en lugar de 2.5 μm, para ese valor tenemos la m3xima amplitud.

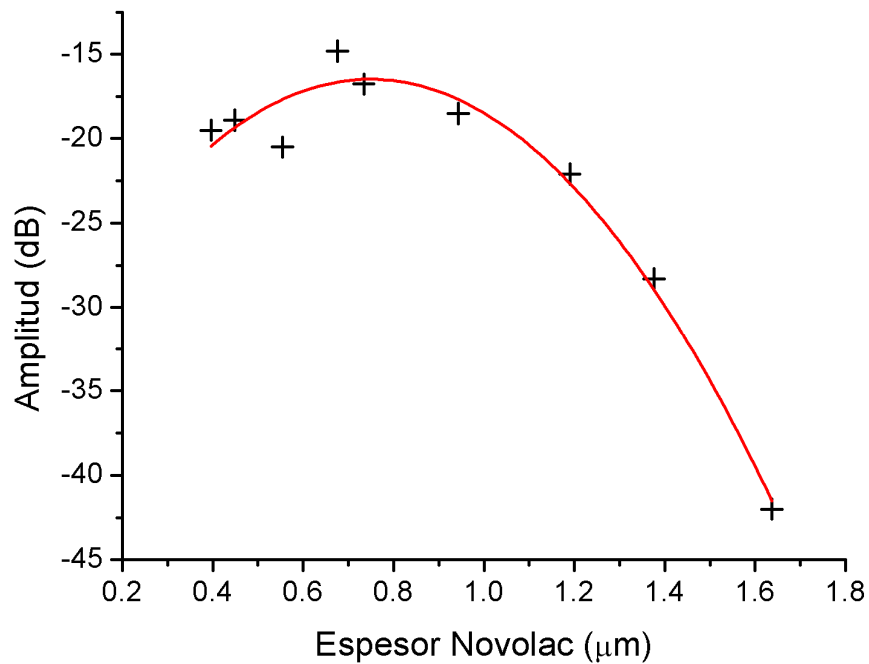


Figura 4.34. Amplitud m3xima para diferentes espesores experimentales de Novolac.

Con las constantes obtenidas para el Novolac, se han recalculado las sensibilidades te3ricas (Fig. 4.35). Para ambos casos la m3xima sensibilidad se obtiene para un espesor de 2 μm, con valores de $-328 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-2}$ para la aproximaci3n propuesta por Z. Wang y de $-296 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-2}$ aproximando por la derivada de la frecuencia respecto al espesor.

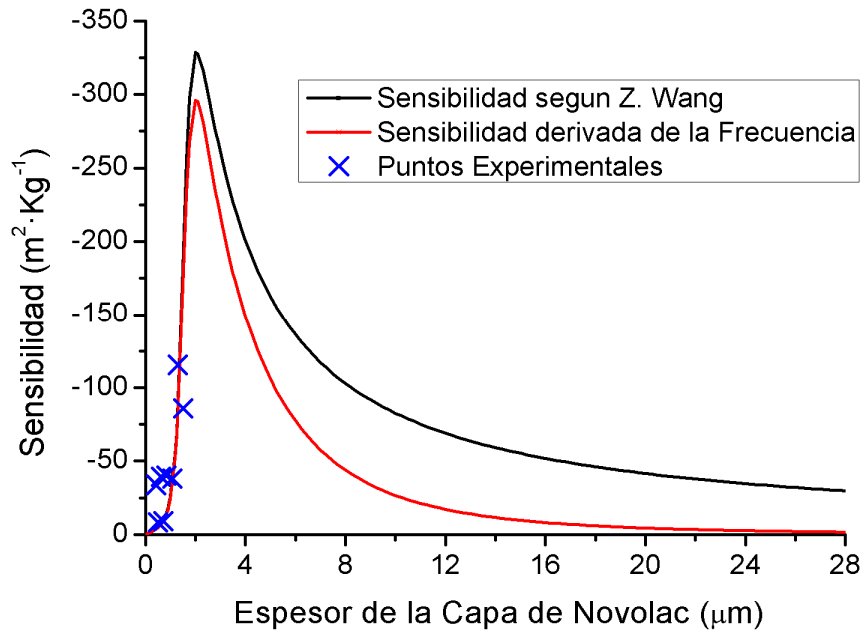


Figura 4.35. Sensibilidades calculadas para el dispositivo con capa guía de Novolac.

Aunque desde el punto de vista de la sensibilidad, el espesor óptimo no sea $0.8 \mu\text{m}$, si que para este espesor el dispositivo exhibe muy buena respuesta en frecuencia, desde el punto de vista del comportamiento de la amplitud y fase (Fig. 4.36).

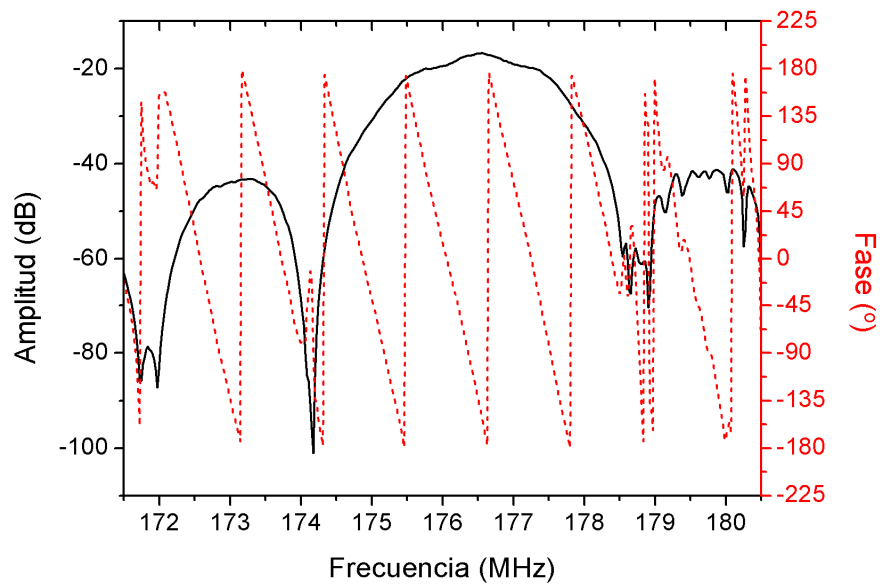


Figura 4.36. Respuesta en frecuencia de la amplitud y la fase para el dispositivo Q11 con capa guía de Novolac de espesor $0.8 \mu\text{m}$.

Tanto en los resultados te3ricos como en los experimentales se ha demostrado que los pol3meros son muy buenos candidatos como capas gu3as desde el punto de vista de la sensibilidad. Pero si se tiene en cuenta la atenuaci3n de la onda, los resultados experimentales muestran la dificultad de utilizar el espesor de pol3mero para el cual se da la m3xima sensibilidad debido a que la atenuaci3n de la onda puede llegar a ser excesiva.

4.3.3. Sistema oscilador de los dispositivos SAW

Los dispositivos SAW se conectan a un circuito que consta principalmente de un amplificador, un acoplador y un filtro, formando un sistema oscilador (Fig. 4.37).

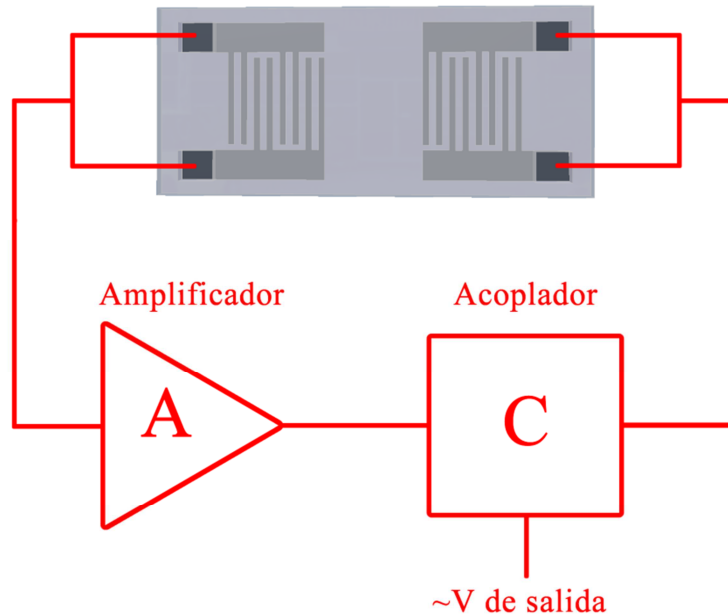


Figura 4.37. Configuraci3n de un oscilador.

Este circuito debe cumplir las condiciones de Barkhausen, es decir, debe cumplir las condiciones de ganancia unitaria en bucle cerrado, lo que s3lo suceder3 a una frecuencia determinada f_0 , que es la frecuencia de oscilaci3n. Estas condiciones son:

$$2\pi f_0 \frac{L_{cc}}{V_p} + 2\phi_{IDT} + \phi_E = 2\pi n$$

$$G_{linea_de_retardo} + G_{amplificadr} + G_{otros_elementos} = 0^+ dB$$

Donde G_x es la ganancia de cada elemento, $2\pi f_0(L_{cc}/V_p)$ es la fase introducida por la línea de retardo y V_p es la velocidad de fase. Φ_{IDT} y Φ_E son las diferencias de fase introducidas por los IDTs y el dispositivo amplificador, que son mucho menores que la de la línea de retardo.

En este trabajo el sistema oscilador que se ha usado con las líneas de retardo consta de dos etapas de amplificación, cada una precedida por un atenuador para evitar acoplamientos, una etapa de filtrado (paso banda), ya que en algunas líneas de retardo existen varios modos de propagación, y por último un acoplador que nos permite dividir la señal en dos, una que realimenta al dispositivo y otra que se usa para medir la frecuencia con un equipo adecuado (Fig. 4.38).

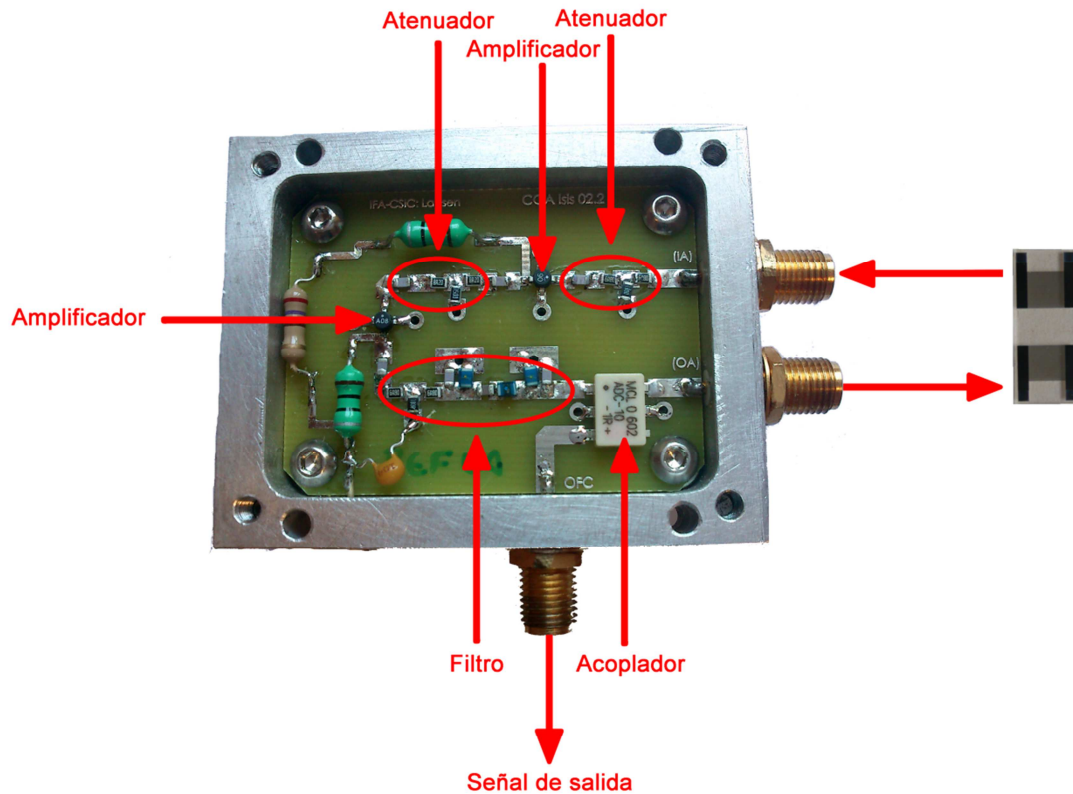


Figura 4.38. Foto del zócalo que alberga el circuito que forma parte del sistema oscilador, que será conectado al dispositivo de RSAW o Love mediante conexiones SMA. Además también tiene una salida SMA que permite leer la señal.

4.3.4. Cámara de medida con array de dispositivos

Como bien es conocido, para identificar compuestos volátiles se necesita utilizar un “array” (matriz) de sensores. Cada dispositivo del array se recubre con un material sensible al analito que se quiera detectar. La elección se realiza teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de ambos. El conjunto de las señales procedentes del array será característico para cada analito, permitiendo discriminarlos y clasificarlos.

Así, los dispositivos se fijaron a una placa PCB, a la cual se pegaron mediante una silicona con una alta conductividad térmica. Los contactos de los IDTs se soldaron a las pistas de dicha placa con hilo de aluminio de 125 μm mediante una soldadora de ultrasonidos (Kulicke and Soffa 4127).

Se ha utilizado una cámara estanca de medida dentro de la cual se colocó la PCB (Fig. 4.39 y 4.40) con los dispositivos. Para conectar los dispositivos SAW al circuito se han utilizado unos conectores SMA-pasamuros a los cuales se ha soldado la placa PCB; de este modo cada dispositivo se ha conectado con un circuito igual al de la Figura 4.38. Además en la cámara se han incorporado un sensor de temperatura (Pt100) y un dispositivo Peltier para mantener los dispositivos a temperatura constante.

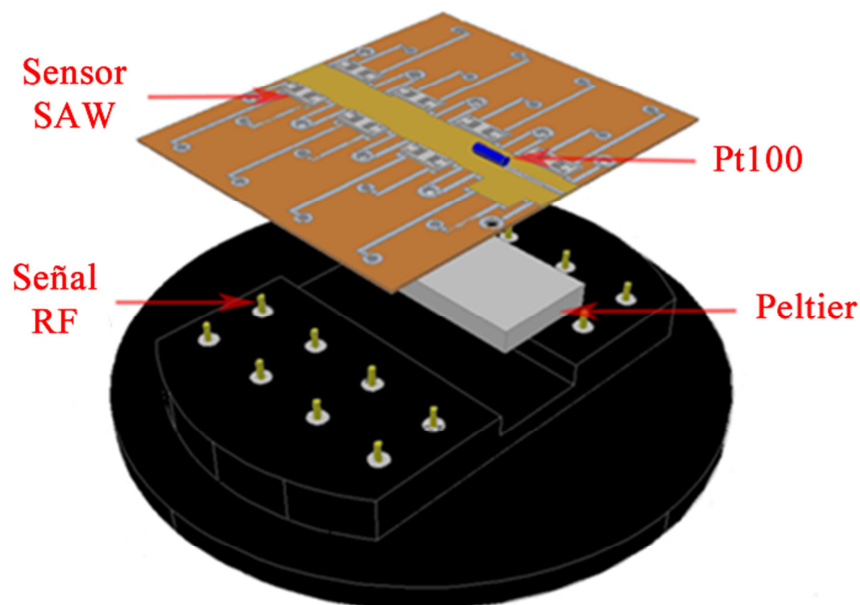


Figura 4.39. Esquema de las diferentes partes de la celda de gases.

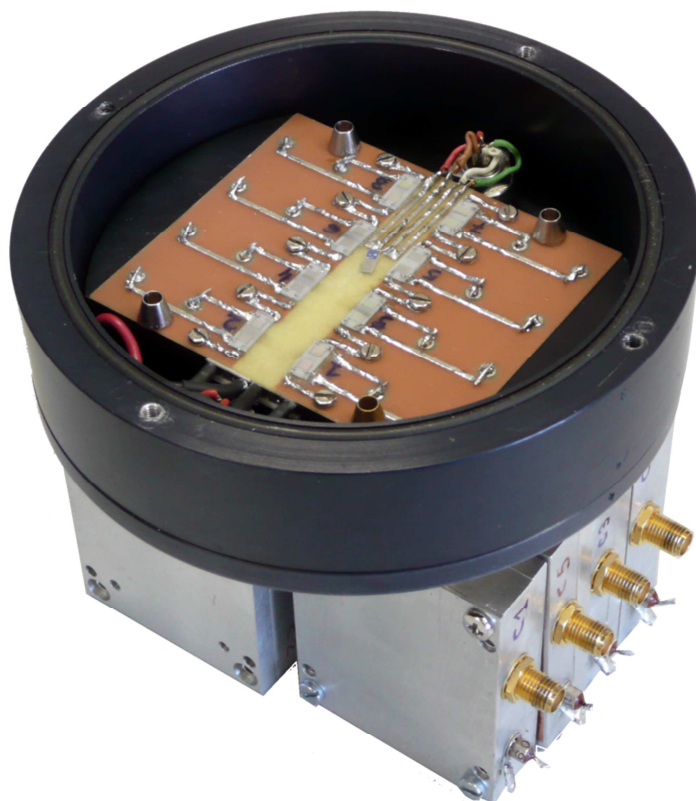


Figura 4.40. Imagen de la PCB alojada en la cámara que está conectada a los circuitos que permiten medir la oscilación de cada dispositivo.

4.3.5. Sistema de extracción de volátiles: Espacio de cabeza

Uno de los principales objetivos de este trabajo ha sido desarrollar un sistema para detectar compuestos volátiles orgánicos (VOCs), en este caso simulantes de agentes de guerra química. Se ha diseñado un sistema para obtener los volátiles del compuesto deseado desde su estado líquido a una temperatura determinada. Para ello se ha utilizado un recipiente cerrado con un volumen de 50 ml que contiene 10 ml de la muestra en estado líquido. La concentración de los volátiles que se desprenden del líquido va incrementando con el tiempo hasta que se llega a un equilibrio termodinámico entre el vapor y el líquido. Se denomina espacio de cabeza al volumen del compuesto en fase vapor una vez alcanzado el equilibrio.

Se ha estimado la concentración de volátiles en el espacio de cabeza utilizando la ecuación de Antoine, mediante la cual se calcula la presión de vapor, P_{vapor} :

$$\log_{10} P_{vapor} = A - \frac{B}{(T + C)} \quad (4-6)$$

Donde T es la temperatura, y A , B y C son los coeficientes de Antoine tabulados para cada compuesto. Las condiciones iniciales en el matraz donde se encuentra el líquido: presión atmosférica, $P_{atmosférica}$, temperatura del baño en el que está sumergido, T , y volumen del espacio de cabeza, V_o . Por tanto el número de moles, n_s , que se evaporan del líquido en el matraz son:

$$\frac{V_o P_{vapor}}{RT} = n_s \quad (4-7)$$

Entonces se tiene n_s moles del compuesto y n_a moles de la atmósfera anterior (aire), para mantener la presión atmosférica en el interior a una temperatura y volumen determinados.

$$\frac{V_o P_{atm}}{RT} = n_{totales} \quad (4-8)$$

Así, habrá una proporción de n_s por cada $(n_s + n_a)$ (moles totales). Multiplicando por 1 millón, tendremos moles por millón (ppm).

$$\frac{n_s}{n_{totales}} = \frac{\frac{V_o P_{vapor}}{RT}}{\frac{V_o P_{atm}}{RT}} = \frac{P_{vapor}}{P_{atm}} \quad (4-9)$$

Una vez estabilizado el espacio de cabeza, un flujo de aire, F_0 , pasa a través de éste arrastrando los volátiles (Fig. 4.41) y se diluye con otro flujo de aire conocido, hasta un flujo total $F_{total} = 200$ ml/min, obteniendo una concentración final:

$$\frac{ppm_{matraz} \cdot F_0}{F_{total}} = ppm_{final} \quad (4-10)$$

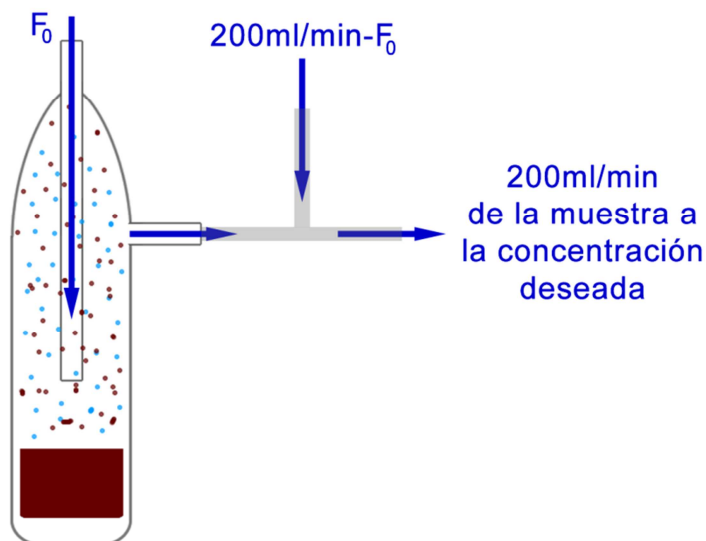


Figura 4.41. Esquema de la extracción de los volátiles que se encuentran en el espacio de cabeza.

4.3.6. Montaje experimental para la caracterización con compuestos volátiles

En la configuración (Fig. 4.42), el aire sintético fue utilizado como gas para arrastrar los volátiles desde el espacio de cabeza hasta la cámara donde se encuentran los sensores. El flujo del aire se establece mediante un controlador másico de flujo (mass flow controller, MFC), con la posibilidad de seleccionar el flujo más conveniente según el rango requerido (0-10 ml/min ó 10-200 ml/min). En el sistema hay dos posibles caminos para el gas de arrastre: el primero sin pasar por la muestra de modo que hasta la cámara de sensores llega el aire “limpio”, y el segundo que pasa por el espacio de cabeza arrastrando y transportando los volátiles hasta la cámara. La selección del camino deseado se realiza mediante electroválvulas. Las concentraciones que se arrastran del espacio de cabeza se pueden diluir con otro flujo de aire sintético controlado por un MFC que trabaja en un rango de 10-200ml/min, pasando finalmente un flujo constante por la cámara de sensores de 200 ml/min. Las concentraciones del compuesto en el espacio de cabeza dependen de la temperatura a la cual se encuentra la muestra, por ello el “matraz” se sumerge en un baño térmico a temperatura constante.

El array est1 formado por varios sensores activos y uno de referencia (un dispositivo sin capa sensible), y para alternar las se1ales recibidas de cada uno de los dispositivos se utiliza un multiplexor de alta frecuencia (Keithley S46) de forma que se pueden medir en el mismo canal de un contador de frecuencia. Durante las medidas se registran tres temperaturas: la de los sensores, la temperatura ambiente y la del ba1o en el que se encuentra la muestra, y todas ellas medidas con resistencias de platino (Pt100) por medio de un mult3metro (Keithley 199). A partir de la lectura de temperatura de los sensores, el controlador PID act1a mediante el dispositivo Peltier para mantener esta temperatura en el valor predeterminado, que conviene que sea cercano a la temperatura ambiente.

Tanto el mult3metro que mide las resistencias, como el contador de frecuencia y el multiplexor se controlan por un protocolo GPIB. Por otro lado los voltajes que controlan el dispositivo Peltier, las electrov3lvulas y los MFC se suministran por medio de una fuente que se comunica con el ordenador mediante el protocolo inal3mbrico Zee Bee (Fig. 4.42).

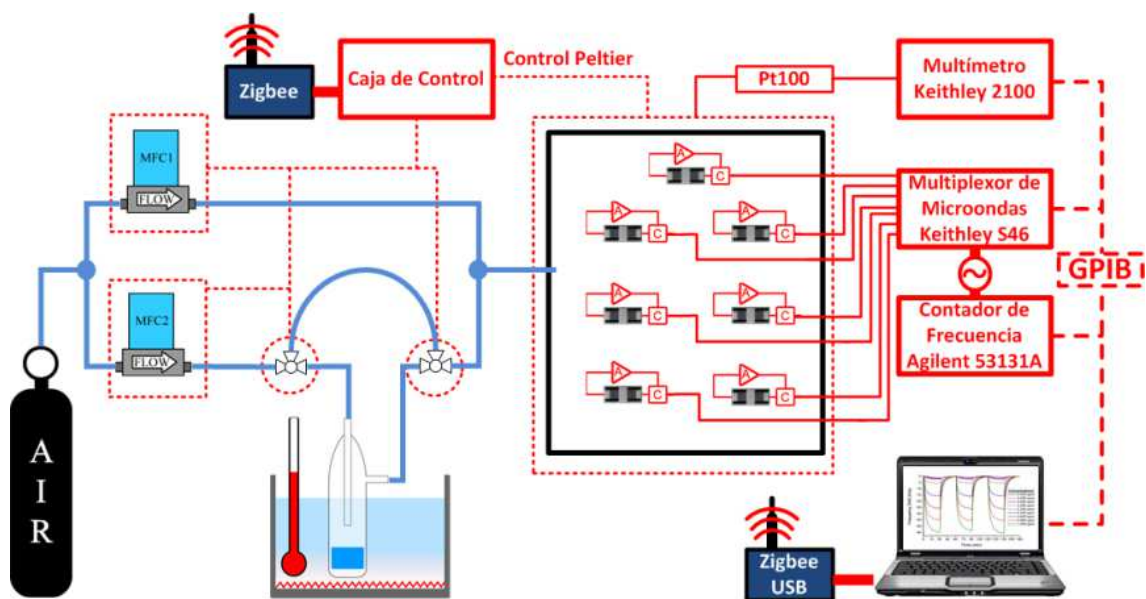


Figura 4.42. Esquema del montaje experimental.

La adquisici3n de datos y el control del experimento se han automatizado mediante un programa que se ha desarrollado en el Laboratorio espec3ficamente para este experimento.

4.3.7. Métodos de reconocimiento de patrones

Generalmente los sistemas multisensores de gases se emplean en dos aplicaciones principales: identificación y cuantificación de compuestos volátiles. Mediante la utilización de sistemas de sensores específicos a determinados compuestos se podría realizar una cuantificación directa, sin más que comparar las señales de los sensores con los valores estándar de calibración. En este caso cada sensor del array respondería sólo a un único compuesto de la mezcla, siempre y cuando hubiese igual o mayor número de sensores que de compuestos. En el caso de los sensores SAW, en más o menos proporción, cada sensor responde a gran parte de los compuestos volátiles, por ello requieren el uso de algoritmos matemáticos para el tratamiento de las señales de salida. Estos algoritmos reciben el nombre genérico de técnicas de reconocimiento de patrones.

4.3.7.1. Reducción de variables: Análisis de componentes principales

El vector de características que resulta de la etapa de pre-procesamiento en muchas ocasiones no es adecuado para ser procesado en los siguientes pasos debido a su alta dimensionalidad y redundancia. Si los patrones son de alta dimensionalidad, el coste computacional asociado a la clasificación puede ser muy alto. Muchos clasificadores están basados en cálculos de distancias y estos cálculos pueden depender de forma cuadrática respecto a la dimensionalidad de los patrones. Como otra consideración computacional hay que considerar el espacio de almacenamiento adicional que supone guardar los valores de nuevas variables. Además, algunas de las variables pueden ser redundantes con otras y no aportar información adicional. El problema de la redundancia es bastante significativo en los arrays de sensores debido a las selectividades parcialmente solapadas de los sensores de gases. Una técnica utilizada para la reducción de variables es el Análisis de Componentes Principales (PCA).

El análisis de componentes principales es una potente técnica de reconocimiento de patrones, no supervisada y lineal basada en la expansión de Karhunen-Loeve [22], que proporciona resultados cualitativos sobre los compuestos [23].

Los vectores respuesta, constituidos por las respuestas de cada sensor a cada muestra realizada, se agrupan en forma de columnas para constituir la matriz respuesta X ($n \times m$) donde n es el número de sensores en el array y m es el número de muestras experimentadas. Por lo tanto el espacio de respuestas es n -dimensional.

El objetivo de la t3cnica de an3lisis de componentes principales es expresar la informaci3n de la matriz respuesta mediante un n3mero menor de variables, variables m3s descriptivas llamadas componentes principales [24]; de esta forma se eliminan los datos redundantes y se reduce la dimensionalidad del problema. La relaci3n entre la matriz respuesta X y la nueva matriz de componentes principales S ($m \times f$) viene dada por la siguiente expresi3n:

$$X = S \cdot F \quad (4-11)$$

donde F ($f \times n$) es la matriz de autovectores o cargas siendo ortogonales o linealmente independientes entre s3, y sus coeficientes cumplen la siguiente restricci3n [25]:

$$\sum_{i=1}^n \alpha_{ki} = 1 \quad (4-12)$$

Esta matriz de autovectores es de un tipo especial denominado ortonormal cuya principal caracter3stica es que la inversa de la matriz es su traspuesta: $F^{-1} = F^T$

Teniendo en cuenta esta relaci3n, las nuevas 'f' variables (componentes principales), se calculan como combinaci3n lineal de las respuestas de los sensores. As3, la k-3sima componente principal de la muestra 'j' se calcula como [24,25]:

$$S_{jk} = \sum_{i=1}^n \alpha_{ki} X_{ji} \quad (4-13)$$

Las componentes principales se eligen de tal manera que en el menor n3mero posible de ellas resida la m3xima varianza de datos, siendo ortogonales entre s3 (inexistencia de correlaci3n entre ellas). El m3todo PCA elimina cualquier redundancia o correlaci3n que exista en las respuestas de los sensores.

Normalmente la n-dimensionalidad del problema se reduce a los dos primeros autovectores (primeras dos componentes principales) que contienen la m3xima informaci3n [26,27,28]. La reducci3n de dimensionalidad se refleja en la existencia de un error en el modelo, que se puede representar mediante la matriz error o residual E en la expresi3n 4-14.

$$X = S \cdot F + E \quad (4-14)$$

Los resultados proporcionados por esta t3cnica se representan mediante un gr3fico que representa las proyecciones de cada muestra sobre el espacio bidimensional que definen las dos primeras componentes principales. Este gr3fico nos revela el mayor o menor

éxito del proceso de clasificación o reconocimiento reflejado en la agrupación de las diferentes muestras en grupos o clases.

4.3.7.2. Clasificación: Redes neuronales

En muchos casos, el objetivo final de los métodos de Reconocimiento de Patrones es el etiquetar de forma automática patrones de los cuales desconocemos su clase.

En primer lugar hay que establecer claramente el objetivo final del sistema, es decir, cual es el conjunto de etiquetas o clases o dicho de otra forma: ¿qué salidas debe proporcionar el sistema? Suponemos que todos los patrones a reconocer son elementos potenciales de un número determinado de clases distintas. En ciertas ocasiones resulta conveniente ampliar el conjunto incorporando una nueva clase, llamada la “clase de rechazo”. Así se define la clase de rechazo como una clase que se asigna a todos los patrones para los que no se tiene una certeza aceptable de ser clasificados correctamente en alguna de las clases existentes.

Una vez establecido el conjunto de clases se procede a la construcción del clasificador. La construcción del clasificador suele involucrar una serie de etapas:

1. La elección del modelo.
2. Aprendizaje (entrenamiento del clasificador).
3. Verificación de los resultados.

Es muy importante señalar que estas etapas no deben verse de forma secuencial. Puede ocurrir que en un momento dado hay que volver atrás para replantearse alguno de los pasos dados, incluso el conjunto de las clases.

Se pueden utilizar indistintamente los términos aprendizaje y entrenamiento para referirse al proceso de construcción del clasificador. El aprendizaje puede realizarse de dos maneras muy diferentes: supervisado o no supervisado.

Un aprendizaje supervisado requiere disponer de un conjunto de patrones de los cuales se conoce a qué clase pertenecen. A este conjunto se le denomina conjunto de entrenamiento. Disponer de un conjunto de entrenamiento supone que alguien se ha preocupado de etiquetar los patrones de ese conjunto.

- **Redes neuronales artificiales**

La técnica de redes neuronales artificiales (ANN) es un método no lineal que puede ser supervisado o no, y que se puede utilizar para extraer información tanto cualitativa como cuantitativa de los datos proporcionados por un determinado sistema, que en nuestro caso es un array de sensores. La utilización de las ANN se ha extendido mucho en la última década debido a su adaptabilidad a prácticamente cualquier función matemática [29].

El desarrollo de las ANN comenzó en los años 60's con el objetivo de proporcionar modelos capaces de presentar algunos principios de funcionamiento del cerebro. En particular aquellos aspectos relacionados con la habilidad del ser humano de aprender de la experiencia y aplicar ese conocimiento adquirido a nuevas experiencias (adaptabilidad del conocimiento).

Desde un punto de vista general, podemos decir que las ANN proporcionan una asociación altamente compleja entre el espacio de entrada y el espacio de salida de patrones o clases. Los vectores de entrada a la red, formados por las respuestas de los sensores, pierden sus propiedades topológicas, son trasladados a espacios de menor dimensión y finalmente reducidos a clases que son las salidas de la red neuronal y que dan cuenta de la detección de los compuestos químicos. Verdaderamente podemos decir que las redes neuronales aprenden una nueva métrica para estimar distancias entre los puntos de la entrada teniendo en cuenta su similitud en el espacio de salida.

- **Funcionamiento de las redes neuronales artificiales.**

Una introducción a las redes neuronales y sus aplicaciones se puede encontrar en la referencia [30]. En resumen, una red neuronal es un grupo de unidades elementales de proceso, llamadas neuronas, conectadas unas con otras de acuerdo con un determinado esquema. Toda la información que adquiere una red neuronal se encuentra diseminada por todos sus elementos.

Una red neuronal está caracterizada por tres elementos básicos [31]:

1. Las unidades de proceso (neuronas).
2. La arquitectura de la red (conexiones entre neuronas).

3. La regla de aprendizaje que proporciona a la red la forma con que aprende de la experiencia.

En la figura 4.43 se puede observar una de las redes más popular, denominada red multicapa alimentada hacia delante.

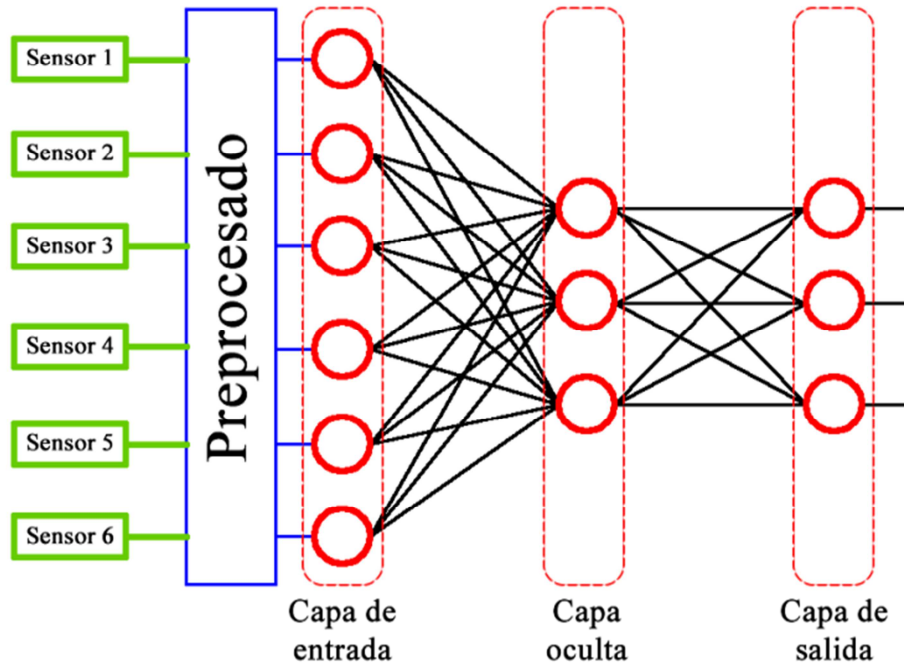


Figura 4.43. Ejemplo de arquitectura de una red neuronal alimentada hacia delante. En ella, se pueden observar los tres tipos de capas neuronales que pueden encontrarse.

La red neuronal está basada en un modelo de la neurona denominado de forma generalizada perceptrón. Como se puede observar en la figura 4.44, en este modelo cada neurona es una unidad de proceso con múltiples entradas y una sola salida.

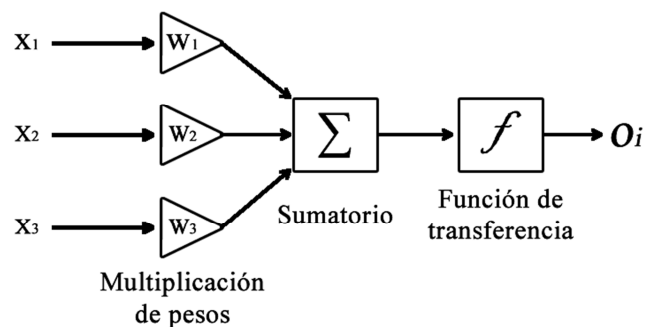


Figura 4.44. Modelo de neurona o perceptrón con sus múltiples entradas X 's, pesadas por los factores W 's, y una única salida O_i .

Este modelo de perceptrón está dividido en dos partes [32]:

La primera parte consiste en una suma de entradas cada una de ellas multiplicada por un factor o peso (w_j):

$$Y_i = \sum_{j=1}^n w_j \cdot x_j \quad (4-15)$$

Los pesos son optimizados de acuerdo a la regla de aprendizaje. La segunda parte está constituida por una función de activación no lineal (f) de la suma obtenida en la primera parte. La transformación no lineal generalmente utilizada es una función sigmoide dada por la expresión 4-16, que limita la salida del perceptrón en el rango $[0,1]$.

$$O_i = \frac{1}{[1+\exp(-Y_i)]} \quad (4-16)$$

Para que la red neuronal pueda solucionar un problema en concreto, es necesario entrenarla con una determinada regla de aprendizaje. Estas reglas de aprendizaje pueden ser supervisadas o no supervisadas. Cuando la regla de aprendizaje empleada es no supervisada, la aplicación de ANN sólo puede estar orientada hacia la clasificación o identificación de compuestos o aromas en disoluciones, mientras que si la regla es supervisada la aplicación de técnica de redes neuronales puede emplearse además para determinar de forma independiente la concentración de estos compuestos de forma individual [31]. Evidentemente este segundo problema de cuantificación es más complicado que el primer problema planteado de detección.

- **ANN con Aprendizaje supervisado.**

La arquitectura de la red neuronal utilizada para el caso de aprendizaje supervisado es el de multicapa alimentada hacia delante. Esto significa que las neuronas pertenecientes a la misma capa no están conectadas entre sí, pero sí con todas las neuronas de la siguiente capa. La primera capa de neuronas se denomina capa de entrada, constituida generalmente por un número de neuronas equivalente al número de sensores que componen el array. La última capa se denomina de salida con un número de neuronas igual al número de compuestos volátiles significativos empleados en las muestras medidas. Las capas intermedias se denominan capas ocultas; el ejemplo de la Figura 4.43 sólo presenta una capa oculta. Respecto al número de capas que tendría que tener una red neuronal, Lippman sugirió que una

red con tres capas (una oculta) tenía los suficientes grados de libertad de cálculo para adaptarse a cualquier tipo de función y solucionar cualquier problema [33,34].

Para entrenar la red neuronal de una manera supervisada es necesario disponer de un conocimiento previo del funcionamiento del sistema en forma de un conjunto de datos de calibración: conjunto de entradas (respuestas de los sensores) con sus correspondientes salidas (compuesto correspondiente y concentraciones de los compuestos químicos de interés en las muestras).

El entrenamiento o aprendizaje de la red consiste en una repetida presentación de los datos de entrenamiento a la entrada de la red con un consecuente ajuste de los pesos de las conexiones en la red según la regla de aprendizaje con objeto de minimizar el error que la red presenta en los datos de validación. Una vez la red ha sido entrenada utilizando los datos de entrenamiento, se comprueba su funcionamiento con el conjunto de datos de validación.

- **Redes Neuronales Probabilísticas (PNN).**

Las redes Neuronales Probabilísticas (PNN) utilizan neuronas con la función de activación Radial Basis, por esta razón frecuentemente también se las denomina redes Radial Basis. La forma de la función de transferencia (Fig 4.45) y la expresión para una neurona Radial Basis es:

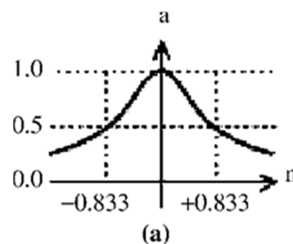


Figura 4.45. Función de transferencia Radial Basis.

$$radbas(n) = e^{-n^2} \quad (4-17)$$

En la Figura 4.46 se muestra una red Radial Basis con una neurona:

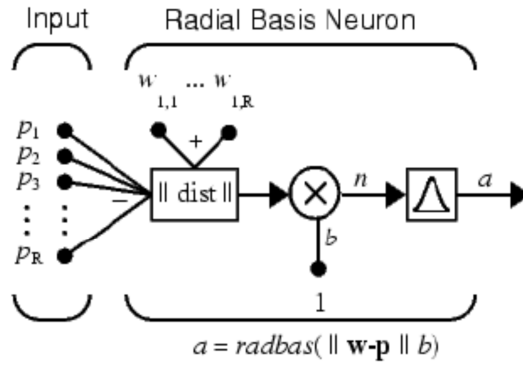
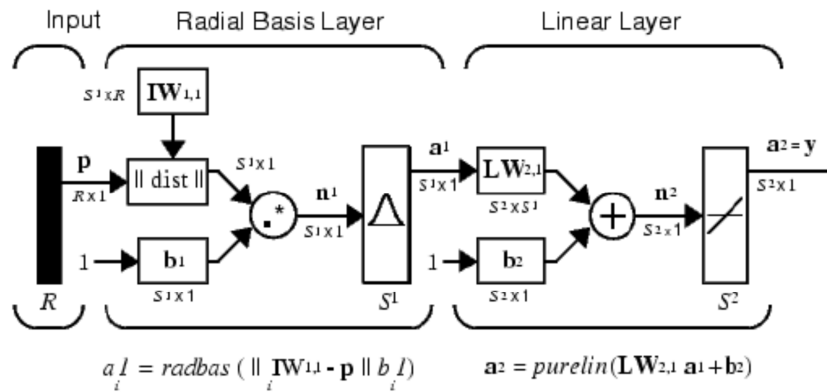


Figura 4.46. Modelo de red Radial Basis con una Neurona.

En esta red, la entrada a la funci3n de transferencia radbas es el vector distancia entre su vector de pesos w y el vector de entrada p , multiplicado por b . La funci3n Radial Basis tiene un m3ximo de 1 cuando su entrada es 0. A medida que la distancia entre w y p decrece, la salida crece. De este modo, una neurona Radial Basis actúa como un detector cuya salida es 1 cuando la entrada p es id3ntica al vector de pesos w .

El par3metro b (bias) permite ajustar la sensibilidad de la neurona radbas. Por ejemplo, si una neurona tiene $b = 0.1$ daría a la salida 0.5 para cualquier vector de entrada p a una distancia de 8.326 ($0.8326/b$) de su vector de pesos w .

La arquitectura de la red PNN consta de dos capas: una capa escondida Radial Basis de S^1 neuronas y una capa lineal de salida de S^2 neuronas como se muestra en la Figura 4.47:


 Figura 4.47. Arquitectura de las Redes Neuronales Probabilísticas. R , es el n3mero de elementos en el vector de entrada.

La operación $\|dist\|$ en esta figura acepta el vector de entrada p y la matriz de pesos de entrada $IW_{I,I}$, y produce un vector con S^I elementos. Los elementos son las distancias entre el vector de entrada y $iIW_{I,I}$ los vectores formados con las filas de la matriz de pesos de entrada.

El funcionamiento de la red es muy sencillo, al presentar un vector de entrada con la red, cada neurona en la capa Radial Basis dará a su salida un valor acorde a la cercanía del vector de entrada al vector de pesos de cada neurona. De este modo, las neuronas con vectores de pesos muy diferentes del vector de entrada tendrán una salida cercana a cero. Estas pequeñas salidas tendrán un efecto despreciable en las neuronas de salida. Por el contrario, una neurona con el vector de pesos cercano al vector de entrada p produce un valor cercano a 1. Si una neurona tiene una salida de 1, sus pesos de salida pasan sus valores a las neuronas lineales en la segunda capa. De hecho, si sólo una neurona Radial Basis tiene una salida de 1, y el resto tienen una salida de 0 (o próximo a 0), la salida de la capa lineal sería los pesos de salida de la neurona activa. Esto sería un caso extremo, generalmente varias neuronas están compitiendo hasta que una de ellas resulta vencedora.

- **Validación.**

Un método comúnmente utilizado para la validación se denomina “leave-one-out” (dejar uno fuera). Este consiste en hacer tantos entrenamientos como medidas se tengan, de tal forma que cada entrenamiento de la red se realiza sin tener en cuenta una medida. Una vez realizado el entrenamiento de la red, se introduce en esta la respuesta de la medida que se había dejado fuera para que la clasifique en una de las clases especificadas. De este modo se obtiene el porcentaje de aciertos y fallos que comete la clasificación de las muestras.

4.4. Dispositivo Love para líquidos

Los dispositivos Love basan su funcionamiento en la propagación de ondas SH, las cuales no tienen una componente perpendicular a la superficie del dispositivo permitiéndolos por tanto trabajar en medios líquidos, a diferencia de los dispositivos RSAW que debido a su componente perpendicular, la energía de la onda se disipa excesivamente al contacto con líquidos.

Se ha modificado el dispositivo Love Q11 que ha trabajado con vapores para trabajar con líquidos, de tal forma que se ha aumentado la separación entre los IDTs, ya que el área sensible, que es la zona entre los IDTs en contacto con el líquido, será definida por un microcanal. Esto permite aislar la zona de los IDTs del líquido, ya que aunque las ondas SH son apropiadas para trabajar en este medio por su moderada amortiguación, la zona de los IDTs es una zona que se caracteriza por generar grandes perturbaciones electromagnéticas al estar en contacto con los líquidos, lo que puede alterar el funcionamiento del dispositivo. Además el objetivo es el desarrollo de dispositivos reutilizables, por lo que se ha aumentado el área de los contactos, para evitar las soldaduras y poder hacer un buen contacto con pines. A diferencia de los dispositivos volátiles, ahora el dispositivo consta de dos líneas de retardo, ya que como se explicará posteriormente en muchos casos se medirá en una línea de retardo y la otra actuará como control, o bien se medirán dos líquidos simultáneamente.

Debido a que el dispositivo se somete a procesos químicos corrosivos, a la zona de aluminio descubierto donde se realizarán los contactos, se le ha aplicado una capa de pintura de plata, que tiene una buena resistencia química a los disolventes y a la presión mecánica de los pines.

El dispositivo Love tendrá unas dimensiones de 30 mm de ancho y 40 mm de largo, y funcionará en líquidos con la misma longitud de onda, $\lambda=28\text{ }\mu\text{m}$, apertura, $W=75\lambda$, y el mismo número de periodos de los IDTs, $N=75$, que para los compuestos volátiles, con la diferencia que la distancia entre los IDTs, L_{cc} , es 225λ (Fig. 4.48), en lugar de 150λ .



Figura 4.48. Imagen de un dispositivo Love diseñado para trabajar en líquidos.

4.4.1. Características físicas de los bioagentes

Los bioagentes pueden ser tratados, desde un punto de vista físico, como partículas esféricas que están suspendidas en un líquido. Si el líquido se encuentra en reposo se producirá un movimiento browniano de los bioagentes, cuyas características fueron expresadas matemáticamente por A. Einstein en la ecuación de difusión, D , de Stocks-Einstein para partículas esféricas en líquidos:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu r} \quad (4-18)$$

siendo k_B [J/K], la constante de Boltzmann, T [K] la temperatura, r [m] el radio de la partícula esférica, y μ [N·s·m⁻²] la viscosidad dinámica de líquido. Un ejemplo práctico puede ser el caso de un bioagente de 100 nm (un virus) en agua a la temperatura de 30°C, para el cual la difusión es aproximadamente $5.6 \cdot 10^{-12}$ m²·s⁻¹; esto quiere decir, que con el líquido en reposo, un virus suficientemente separado de la superficie se acercará hacia ésta una distancia máxima aproximada de $2 \cdot 10^{-4}$ m en una hora. Este desplazamiento es muy lento y en un sistema de detección, es de interés que el máximo número de bioagentes llegue rápidamente a la superficie e interaccionen con el elemento identificador, con el fin de obtener la mayor respuesta posible del sensor en el menor tiempo. Por esta razón, en lugar de un sistema estático de medida se ha propuesto en este trabajo un sistema dinámico (flujo continuo), ya que en este último, el desplazamiento de bioagentes por circulación de la muestra prevalecerá respecto al de difusión, lo que significa un gran incremento del número de reacciones con el elemento identificador en la superficie del sensor.

4.4.2. Microfluídica

Para trabajar en un modo dinámico, de tal forma que el líquido circule por la superficie del sensor, se han utilizado unos microcanales, que confinan el líquido entre los IDTs. Además, estos dispositivos se han desarrollado para aplicaciones de seguridad y por tanto el uso de microfluídica se ha encontrado muy apropiado, ya que permite trabajar con muy pequeños volúmenes de muestras, teniendo en cuenta que generalmente su manipulación es una amenaza para la salud.

Es importante a la hora de dise1ar el microcanal tener en cuenta su altura; para ello se ha considerado en primer lugar la penetraci3n de la onda en el l3quido [35], δ [m], que es para un fluido newtoniano el valor para el cual la amplitud de la velocidad se reduce en un factor e^{-1} y viene cuantificada, por:

$$\delta = \sqrt{2\mu/\rho\omega} \quad (4-19)$$

donde μ [$N \cdot s \cdot m^{-2}$] es la viscosidad del l3quido, ρ [$kg \cdot m^{-3}$] es la densidad y ω [$rad \cdot s^{-1}$] el pulso de la onda ac3stica. En el caso del agua para una temperatura a 30 °C, $\delta=37$ nm. Por tanto la penetraci3n de la onda es mucho menor que las dimensiones de algunos bioagentes. Un ejemplo son las bacterias que llegan a medir hasta 10 μm (uno de los bioagentes de mayor tama1o). Por esta raz3n se ha elegido una altura del microcanal de 150 μm , de este modo se puede asegurar la circulaci3n de cualquier bioagente.

Para evitar que las diferentes especies (anticuerpos y bioagentes) que se puedan introducir a lo largo de un experimento terminen mezcl3ndose, el flujo debe ser laminar, lo que viene determinado por el n3mero adimensional de Reynolds, Re , que relaciona las fuerzas de inercia con las fuerzas de viscosidad, a trav3s de:

$$Re = \frac{\rho V_0 L_0}{\mu}$$

siendo ρ [$kg \cdot m^{-3}$] la densidad, V_0 [$m \cdot s^{-1}$] la velocidad, L_0 la dimensi3n caracter3stica y μ [$N \cdot s \cdot m^{-2}$] la viscosidad del l3quido. Para el caso del agua a una temperatura de 30 °C, una distancia caracter3stica igual a la anchura m3xima anchura del microcanal (separaci3n entre los IDTs) igual a $4.2 \cdot 10^{-3}$ m, y una velocidad m3xima en el centro del microcanal de 10^{-3} m/s, se obtiene $Re \approx 5$, que es mucho menor que 2000, l3mite en el cual se pasa de un r3gimen laminar a turbulento; luego queda demostrado que el l3quido circula en r3gimen laminar.

Tambi3n es importante que en la parte del microcanal, que se encuentra entre los IDTs, y por tanto la que atraviesa la onda ac3stica, la velocidad sea constante, porque de este modo la medida se har3 a mayor velocidad y ser3 m3s uniforme uniformidad. Para comprobarlo se ha utilizado el programa Comsol como herramienta de simulaci3n de procesos f3sicos, y diferentes dise1os se sometieron a simulaci3n hasta que se encontr3

un diseño que cumple con los requisitos anteriormente expuestos, la solución de la simulación se muestra a continuación (Fig. 4.49).

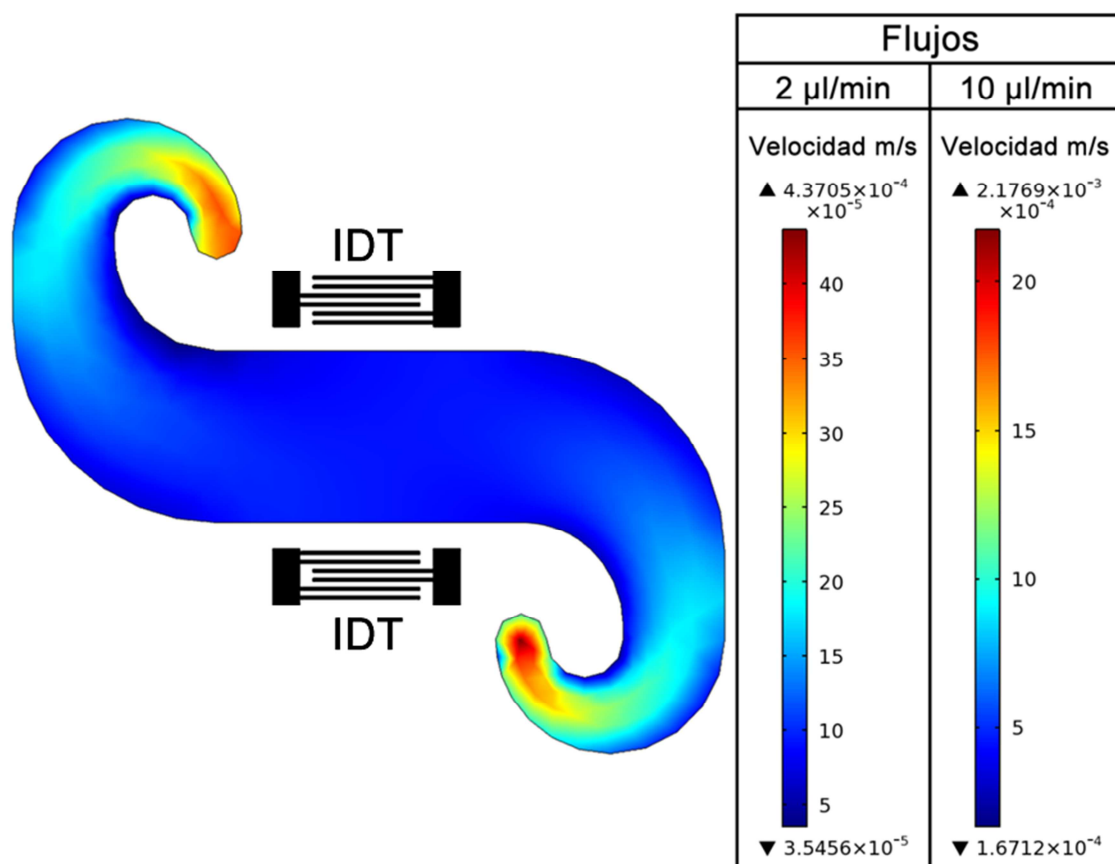


Figura 4.49. Simulación 2D de la geometría del microcanal mediante el programa Comsol.

4.4.3. Chip de PDMS para la formación de microcanales

Para conseguir estos microcanales se ha utilizado un chip de PDMS, que tiene unas hendiduras con la forma del microcanal, de tal forma que al unir el dispositivo Love y el chip de PDMS, se forman los microcanales. Pero además de los microcanales se necesitan unas cámaras de aire en la zona de los IDTs, para evitar que estén en contacto con el líquido y con el PDMS. Por lo tanto es necesaria la existencia de un muro que sirva como aislamiento entre la cámara de aire que protege el IDT y el microcanal, quedando ambos totalmente incomunicados. El PDMS es un material que absorbe gran cantidad de energía de las ondas acústicas, lo que se ha tenido muy en cuenta en los siguientes puntos:

- Por un lado el PDMS, en contacto con el chip se aprovechar3 como una ventaja para amortiguar la energ3a que se propaga hacia atr3s desde el IDT generador hasta el borde del dispositivo.
- Por otra parte dos muros se interpondr3n en el camino de la onda ac3stica a lo largo de L_{cc} , que separar3n el microcanal de la zona de los IDTs. Los muros por una parte atenuar3n la amplitud de la onda y por otra parte evitar3n las fugas de los l3quidos hacia los IDTs, por ello es importante poner atenci3n al determinar su anchura. Debido a que el microcanal tiene una altura de $150\text{ }\mu\text{m}$ se ha elegido los muros con la misma anchura, de esta forma se asegura que 3stos no se deforman al presionar mec3nicamente contra el dispositivo Love.

Por tanto se ha realizado un chip de PDMS con la misma 3rea que el dispositivo Love (30 mm de ancho y 40 mm de largo), y 2 mm de altura.

Se utiliza un molde de SU8 como m3ster para obtener tantas r3plicas del chip de PDMS como sea necesario. Mediante un proceso fotolitogr3fico se definen las estructuras de los microcanales y de las cavidades sobre los IDTs (Fig. 4.50). El espesor del microcanal y de las cavidades, $150\text{ }\mu\text{m}$, vendr3 definido por el espesor de la fotorresina SU-8 2025. Antes del proceso de litograf3a, se deshidrata la oblea de silicio a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min . Luego se deposita una capa de SU-8 50 sobre la oblea a 1000 rpm durante 30 segundos para obtener el espesor deseado de $150\text{ }\mu\text{m}$. Un primer tratamiento t3rmico, consistente en diferentes temperaturas aplicadas por contacto directo, y se lleva a cabo en los siguientes pasos: reposo de 60 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de 6 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 h enfri3ndose a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. La exposici3n a radiaci3n UV se realiza con una dosis de $260\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$. Despu3s se somete a un segundo tratamiento t3rmico que consiste en 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, y a continuaci3n un enfriamiento de 10 h hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente, la capa de resina se revela con agitaci3n durante 15 min en el revelador mr-600 Dev, y los restos de la fotorresina sin polimerizar y el revelador se eliminan mediante limpieza con alcohol isoprop3lico y agua desionizada. El resultado se puede ver en la Figura 4.50.

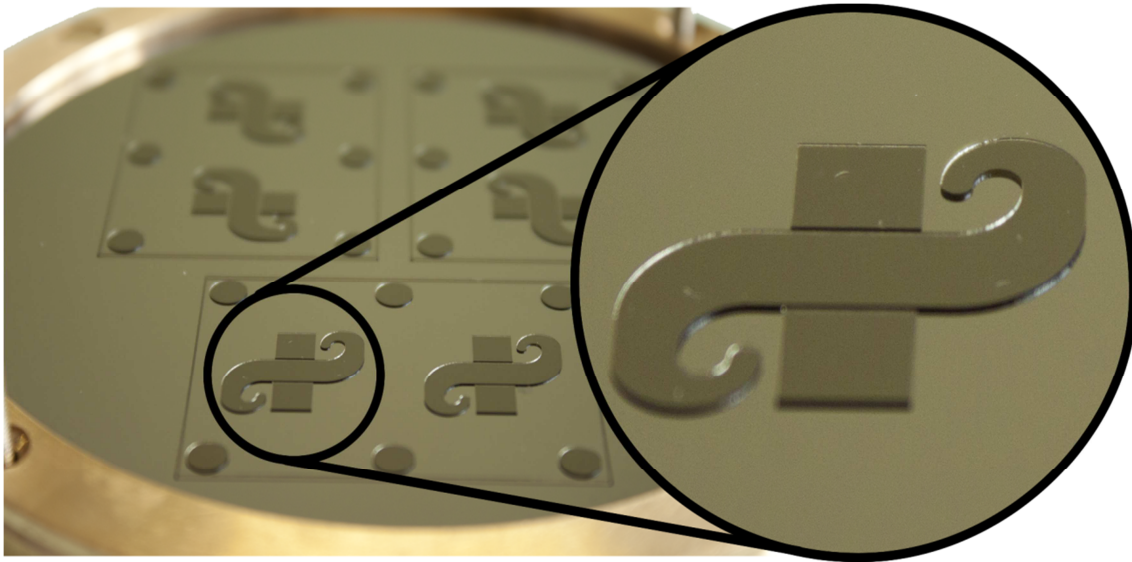


Figura 4.50. Foto del máster de SU-8 en la que se muestran la forma de la plantilla que definirá el microcanal y las cámaras protectoras de los IDTs

El prepolímero PDMS y el agente de curado (ELASTOIL 601 RT) se mezclan en una proporción 9:1 y durante 10 min se pone la mezcla en vacío para eliminar las burbujas. El master de SU-8 se fija sobre una base mediante un anillo metálico, el cual determina el espesor de PDMS (Fig. 4.51). Seguidamente se cubre con una tapa de metacrilato para que quede un chip de espesor uniforme y una superficie plana. Después se pone en vacío durante una hora para eliminar las burbujas a través de tres orificios que se encuentran en la placa de metacrilato. Un tratamiento térmico a 85 °C durante una hora hace que el PDMS termine de polimerizar. Finalmente el PDMS se despega fácilmente del master y se corta para obtener de cada proceso tres chips idénticos (Fig. 4.52). Las entradas y salidas del microcanal para que pase el líquido se realizan con agujas hipodérmicas de 1 mm de diámetro, con el fin de hacer un conducto cilíndrico limpio.

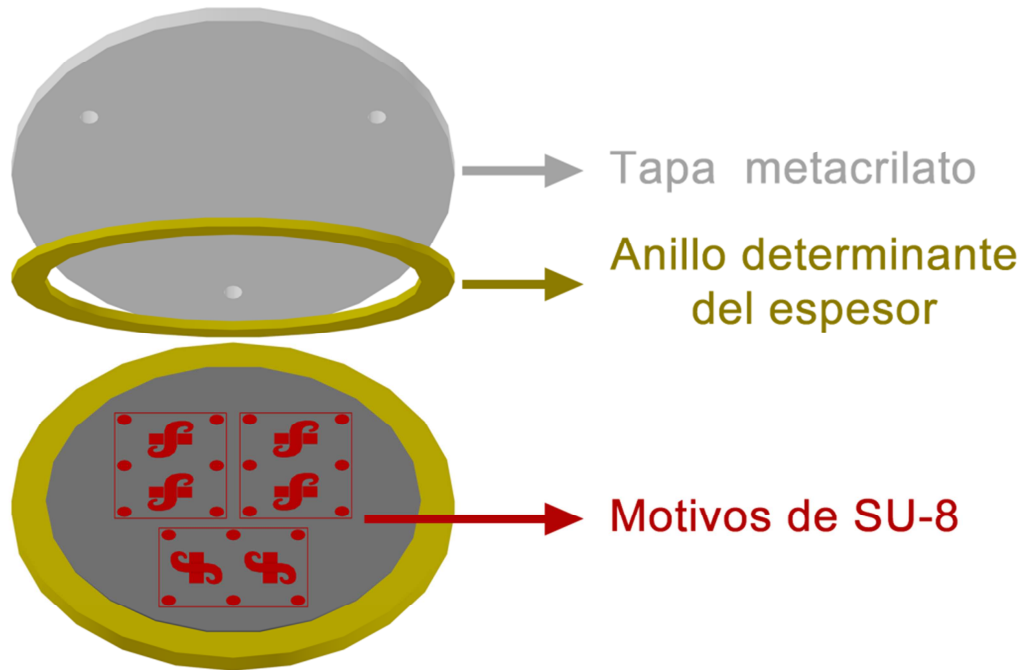


Figura 4.51. Esquema del molde completo para fabricar chips de PDMS.

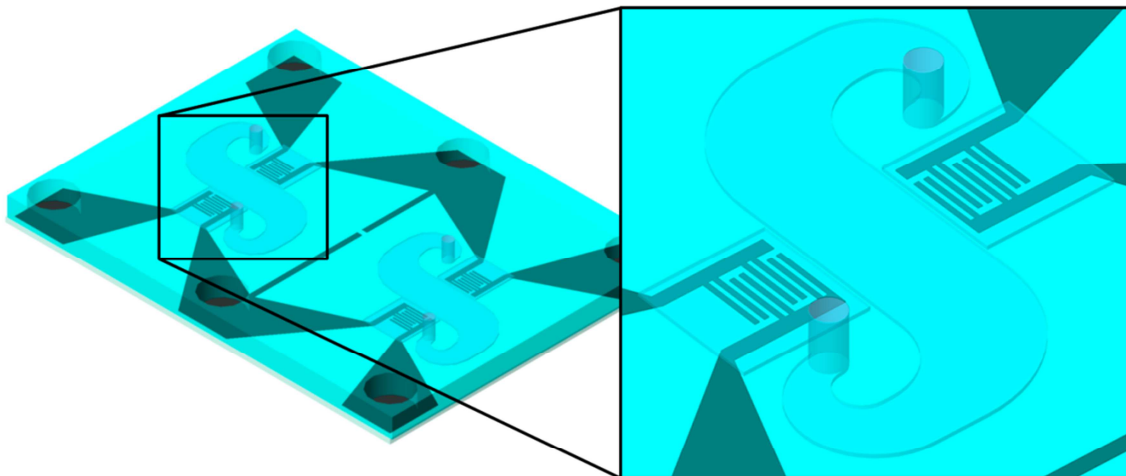


Figura 4.52. Dispositivo Love y chip de PDMS unidos formando los microcanales y las cámaras de protección de los IDTs. En la ampliación de la derecha se puede apreciar como ambos están separados por un estrecho muro.

4.4.4. Control de temperatura del sistema

Se ha diseñado un sistema de control de temperatura para el dispositivo Love para líquidos, en el que se combinan:

- Un dispositivo Peltier que permite termostatar el zócalo donde se encuentra el dispositivo Love. Dicho zócalo realizado en aluminio, debido a su gran conductividad térmica, permite que la temperatura del dispositivo sea homogénea, y además, por su baja capacidad calorífica el dispositivo Peltier podrá actuar sobre su temperatura en un corto tiempo. Ambos, el zócalo y el dispositivo Peltier, están en contacto a través de una silicona conductora.
- Una resistencia de Platino (Pt100) que se sitúa en una cavidad entre el zócalo y el dispositivo Love, y es capaz de medir la temperatura con una incertidumbre de ± 0.1 °C. Para medir dicha resistencia se ha utilizado un multímetro (Keithley 199) conectado por medio de “cuatro puntas”.
- Un controlador PID, que cada dos segundos mide la resistencia de la Pt100, procesando y almacenando los datos de temperatura para finalmente actuar sobre el dispositivo Peltier mediante una fuente de potencia (Agilent E3646A), manteniendo la temperatura lo más próxima posible a la temperatura deseada, y con un ruido menor que 0.004 °C (Fig. 4.53).
- Un disipador de aluminio que se utiliza para poder enfriar y calentar en tiempos cortos y promover el intercambio de calor con el ambiente. Ambos, el zócalo que aloja al dispositivo Love y el disipador se encuentran en contacto con las caras opuestas del Peltier y separados por un marco de acero inoxidable, ya que este metal tiene baja conductividad térmica. Además el marco de acero se utiliza para fijar el resto de piezas de la celda de medida.
- Un ventilador es necesario para que el intercambio de calor entre disipador y ambiente sea más rápido.

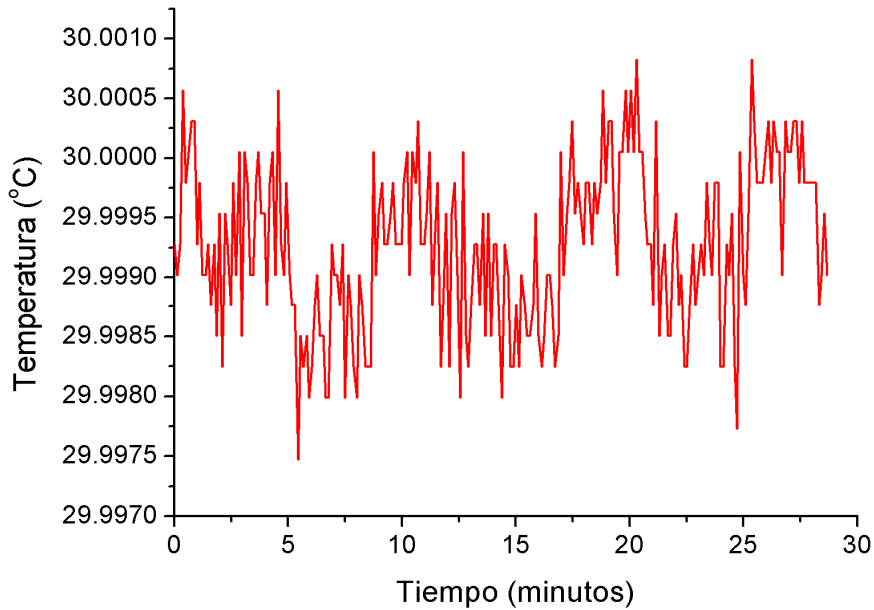


Figura 4.53. Ejemplo de las temperaturas del dispositivo Love trabajando con líquidos, para una temperatura objetivo de 30 °C.

4.4.5. Otros componentes de la celda de líquidos.

Para que los microcanales no tengan fugas se utiliza generalmente un sellado químico entre el PDMS y el SiO₂ [36,37], pero teniendo en cuenta que el objetivo es el desarrollo de un sistema en el cual tanto el dispositivo de ondas acústicas como el chip de PDMS sean reusables, se ha elegido un sellado de los microcanales por presión mecánica. Por tener que formar una estructura compacta para que en el microcanal no haya fugas, y por ser el muro que separa el microcanal y las cámaras de los IDTs una zona especialmente frágil, se ha utilizado una pieza de metacrilato de tal forma que ejerza una presión por contacto en el chip de PDMS (zona donde se encuentran los microcanales y las cavidades que protegen los IDTs), presionándolo contra el dispositivo Love, lo que ha permitido la obtención de un sistema sin problemas de fugas. Para que la pieza de metacrilato ejerza presión se encaja en una tapa superior, que se aprieta mediante unos tornillos roscados en el marco de acero (Fig. 4.54).

Para poder llevar la señal RF hasta el circuito amplificador, se ha utilizado una placa microstrip diseñada y fabricada en el Laboratorio, que dispone de seis pines para hacer conectar el dispositivo Love, y de cuatro conectores SMA para conectar los circuitos.

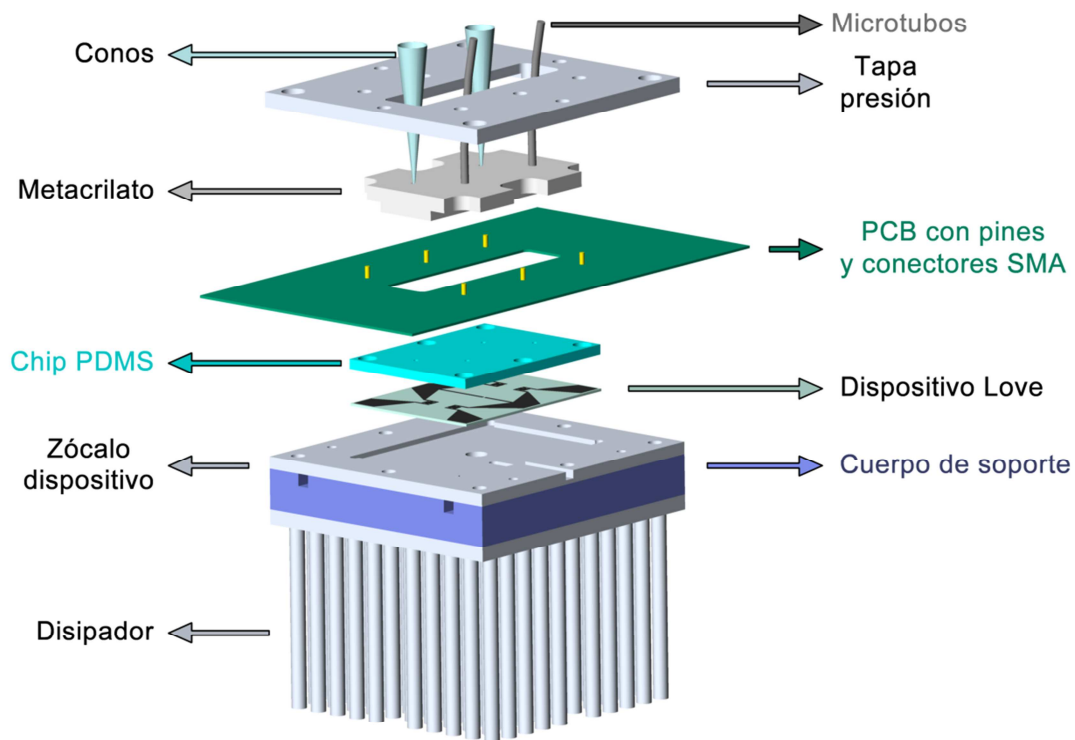


Figura 4.54. Esquema de la celda de líquidos en el que se muestran los diferentes componentes de la celda de líquidos.

4.4.6. Montaje experimental para la caracterización de bioagentes

Los protocolos de medida se basan en una circulación continua del líquido por el microcanal, de tal forma que a un lado del microcanal se ponen unos conos con marcación de volumen (puntas de micropipeta), en los cuáles se deposita la muestra que deseamos medir. Al otro lado se disponen unos microtubos que conectan la bomba de jeringas (KDScientific 210) con el microcanal. Esta bomba trabaja en modo de aspiración, produciendo un movimiento constante del líquido que se encuentra en los conos, el cual circula por el microcanal y finalmente llega por medio de los microtubos a las jeringas, en las cuales quedan almacenadas todas las muestras utilizadas en el experimento a modo de residuo. La velocidad del líquido a través del microcanal se ajusta mediante la velocidad que se seleccione en la bomba de jeringas (Fig. 4.55)

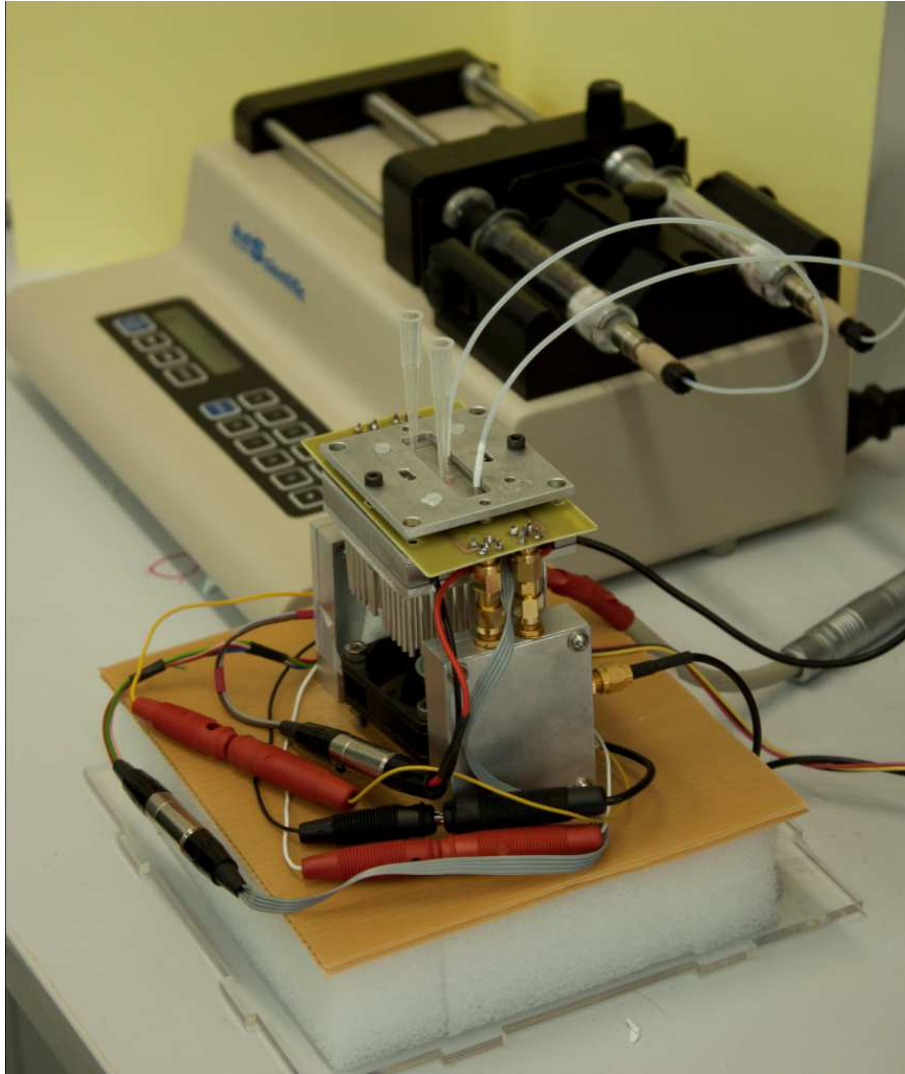


Figura 4.55. Foto de la celda de líquidos y bomba de jeringas.

Cada línea de retardo del dispositivo Love está conectada a un circuito amplificador, oscilando independientemente. Y cada uno de estos circuitos permite transmitir parte de la energía de la señal a cada uno de los canales del contador de frecuencias (Agilent 53131A). Tanto el contador de frecuencias, como el multímetro que mide la resistencia de la Pt100, la fuente de alimentación que controla el Peltier y la adquisición de datos, se controlan por un programa desarrollado específicamente para este montaje experimental a través de un protocolo GPIB (Fig. 4.56).

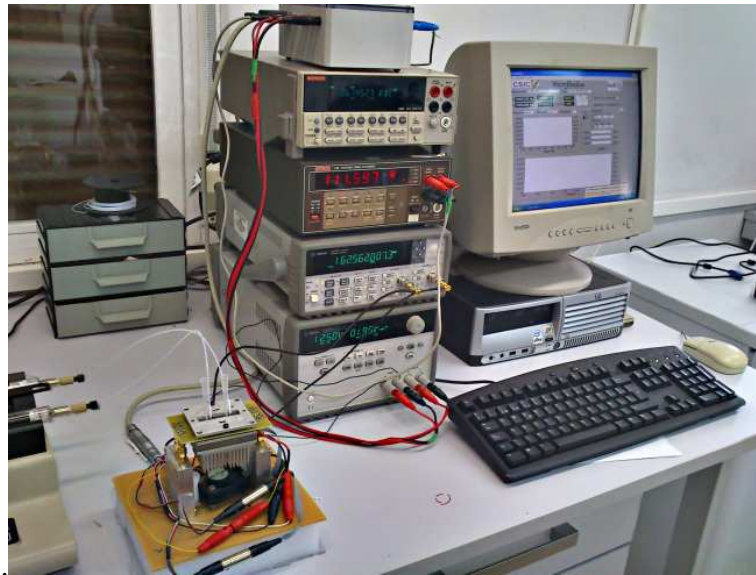


Figura 4.56. Foto del montaje experimental.

4.5. Conclusiones

Se han desarrollado dos tipos de dispositivos SAW: unos basados en ondas Rayleigh (RSAW) y otros basados en ondas Love con diferentes capas guías. La sensibilidad de los RSAW depende de los parámetros del sustrato piezoeléctrico y de la frecuencia de funcionamiento del dispositivo, sin embargo la sensibilidad de los dispositivos Love es más compleja, porque además también depende del material de la capa guía y su espesor. La ecuación de dispersión de las ondas Love ha permitido conocer a priori la frecuencia síncrona para las diferentes configuraciones de los dispositivos, permitiendo estimar el espesor para el cual se obtiene la mayor sensibilidad para cada material usado como capa guía. Seguidamente se ha procedido a la fabricación de los dispositivos con diferentes espesores para cada capa guía, intentando obtener la máxima sensibilidad, pero sin comprometer la atenuación del dispositivo. Finalmente se han ajustado los parámetros del material de la capa guía para que coincidan los resultados teóricos con los experimentales, permitiendo conocer el módulo transversal, la densidad y la velocidad de los materiales depositados como capas guías.

Se ha demostrado que en relación con la sensibilidad los polímeros como Novolac son muchos más apropiados como capas guías que el caso del SiO_2 , y esto se debe a que la velocidad de propagación de las ondas SH en polímeros es mucho menor SiO_2 . El

inconveniente que tienen los pol3meros es que atenúan de forma excesiva la onda propagada. Por lo que no se puede llegar al espesor para el cual los dispositivos tendrían su mayor sensibilidad.

Los dispositivos Love con capa guía de SiO₂, presentan el problema de interferencia debido al fenómeno de eco de triple tránsito (TTE) cuando se utilizan electrodos simples. Lo que se debe a la presencia de escalones en la superficie cuando se deposita la capa de SiO₂ sobre los electrodos. Se ha demostrado que el fenómeno de TTE desaparece cuando se somete la superficie de SiO₂ a un proceso de pulido que permite eliminar casi por completo los escalones. Aunque se ha elegido desdoblar el simple electrodo debido a la simplicidad del proceso de fabricación.

Se presenta los montajes experimentales para medir compuestos volátiles con arrays de dispositivos SAW.

El dispositivo Love basado en cuarzo/SiO₂ se ha utilizado para el desarrollo de un sistema de detección de bioagentes en medio líquido, el cual trabajará en un modo dinámico. Con este objetivo ha diseñado y desarrollado un chip de PDMS que posibilita el uso de microfluídica.

4.6. Referencias

- [1] M Penza, G Cassano, Relative humidity sensing by PVA-coated dual resonator SAW oscillator, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 68, Issues 1–3, 25 August 2000, pp. 300-306.
- [2] S.-M. Chang, E. Tamiya, I. Karube, M. Sato, Y. Masuda, Odorant sensor using lipid-coated SAW resonator oscillator, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 5, Issues 1–4, August 1991, pp. 53-58.
- [3] S.-M. Chang, E. Tamiya, I. Karube, Chemical vapour sensor using a SAW resonator, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 6, Issue 1, 1991, pp. 9-14.
- [4] D. Rebière, C. Déjous, J. Pistré, J.F. Lipskier, R. Planade, Synthesis and evaluation of fluoropolyol isomers as saw microsensor coatings: role of humidity and temperature, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 49, Issues 1–2, 25 June 1998, pp. 139-145.

- [5] C. Déjous, D. Rebière, J. Pistré, C. Tired, R. Planade, A surface acoustic wave gas sensor: detection of organophosphorus compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 24, Issues 1–3, March 1995, pp. 58-61.
- [6] J. Lozano, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, M. Aleixandre, J.P. Santos, I. Sayago, T. Arroyo, J.M. Cabellos, F.J. Gutiérrez, M.C. Horrillo, Wine classification with a zinc oxide SAW sensor array, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 120, Issue 1, 14 December 2006, pp. 166-171.
- [7] M.C. Horrillo, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, I. Sayago, M. García, M. Aleixandre, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, Optimization of SAW sensors with a structure ZnO–SiO₂–Si to detect volatile organic compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 118, Issues 1–2, 25 October 2006, pp. 356-361.
- [8] H. Wohltjen, A.W. Snow, W.R. Barger, D.S. Ballantine, Trace chemical vapor detection using SAW delay line oscillators, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, UFFC-34 (1987), pp. 172–178.
- [9] J. Fontecha, M.J. Fernández, I. Sayago, J.P. Santos, J. Gutiérrez, M.C. Horrillo, I. Gràcia, C. Cané, E. Figueras, Fine-tuning of the resonant frequency using a hybrid coupler and fixed components in SAW oscillators for gas detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 103, Issues 1–2, 29 September 2004, pp. 139-144.
- [10] J. Grate, S. Martin, R. White, Acoustic wave micro-sensors: Part I., *Anal. Chem.* 65 (1993) 940–948.
- [11] Z. Wang, J. D. N. Cheeke, and C. K. Jen, Sensitivity analysis for Love mode acoustic gravimetric sensors, *Applied Physics Letters*, 64 (22), 1994, pp. 2940-2942.
- [12] N. Barié, T. Wessa, M. Bruns, M. Rapp, Love waves in SiO₂ layers on STW-resonators based on LiTaO₃, *Talanta*, Volume 62, Issue 1, 9 January 2004, pp. 71-79.
- [13] http://www.mit.edu/~6.777/matprops/pecvd_sio2.htm
- [14] Ollivier Tamarin, Corinne Déjous, Dominique Rebière, Jacques Pistré, Sylvie Comeau, Daniel Moynet, Jean Bezan, Study of acoustic Love wave devices for real

time bacteriophage detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 91, Issues 1–3, 1 June 2003, pp. 275-284.

[15] A Leidly, I Oberlack, U Schaber, B Mader, S. Drost, Surface acoustic wave devices and applications in liquid sensing, *Smart Mater. Struct.* 6 (1997) 680–688.

[16] E. Gizeli, F. Bender, A. Rasmusson, K. Saha, F. Josse, R. Cernosek, Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of the waveguide properties, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 18, Issue 11, 1 October 2003, pp. 1399-1406.

[17] Wen Wang, Shitang He, Theoretical analysis on response mechanism of polymer-coated chemical sensor based Love wave in viscoelastic media, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 138, Issue 2, 6 May 2009, pp. 432-440.

[18] E Gizeli, N.J Goddard, C.R Lowe, A.C Stevenson, A Love-plate biosensor utilizing a polymer layer, *Sens. Actuators B*, 6 (1992), pp. 131–137.

[19] T Wessa, N Bari3, M Rapp, H.J Ache, Polyimide, a new shielding layer for sensor applications, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 53, Issues 1–2, 26 November 1998, pp. 63-68.

[20] A.C Stevenson, E Gizeli, N.J Goddard, C.R Lowe, Acoustic Love-plate sensors: a theoretical model for the optimization of the surface mass sensitivity *Sens. Actuators B*, 13/14 (1993), pp. 635–637.

[21] <http://www.mit.edu/~6.777/matprops/pmma.htm>

[22] J. Kittler y P.C. Young, *Pattern Recognition*, 5 (1973) 335-352.

[23] W.Patrick Carey, Kenneth R. Beebe, Eugenio Sanchez, Paul Geladi, Bruce R. Kowalski, Chemometric analysis of multisensor arrays, *Sensors and Actuators*, Volume 9, Issue 3, May 1986, pp. 223-234.

[24] Eduard Llobet, Jes3s Brezmes, Xavier Vilanova, Jes3s E. Sueiras, Xavier Correig, Qualitative and quantitative analysis of volatile organic compounds using transient and

steady-state responses of a thick-film tin oxide gas sensor array, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 41, Issues 1–3, 30 June 1997, pp. 13-21.

[25] Julian W. Gardner, Detection of vapours and odours from a multisensor array using pattern recognition Part 1. Principal component and cluster analysis, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 4, Issues 1–2, May 1991, pp. 109-115.

[26] P. McAlernon , Jonathan M. Slater , P. Lowthian, M. Appleton, Interpreting signals from an array of non-specific piezoelectric chemical sensors, *Analyst*, 1996,121, 743-748.

[27] Hidehito Nanto, Shiro Tsubakino, Mitsuo Ikeda, Fumitaka Endo, Identification of aromas from wine using quartz-resonator gas sensors in conjunction with neural-network analysis, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 25, Issues 1–3, April 1995, pp. 794-796.

[28] S. L. Rose-Pehrsson, J. W. Grate, D. S. Ballantine, Jr., and P. C. Jurs, *Anal. Chem.* 60 (1988), 2801-2811.

[29] H. Sundgren, I. Lundström, F. Winqvist, I. Lukkari, R. Carlsson, S. Wold, Evaluation of a multiple gas mixture with a simple MOSFET gas sensor array and pattern recognition, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 2, Issue 2, May 1990, pp. 115-123.

[30] A.J Maren (Ed.), *Handbook of Neural Computing Applications*Wiley, London (1991).

[31] M. Schweizer-Berberich, J. Göppert, A. Hierlemann, J. Mitrovics, U. Weimar, W. Rosenstiel, W. Göpel, Application of neural-network systems to the dynamic response of polymer-based sensor arrays, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 27, Issues 1–3, June 1995, pp. 232-236.

[32] J.W. Gardner, E.L. Hines, H.C. Tang, Detection of vapours and odours from a multisensor array using pattern-recognition techniques Part 2. Artificial neural networks, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 9, Issue 1, July 1992, pp. 9-15.

[33] R. P. Lippmann, An Introduction to Computing with Neural Nets, *IEEE ASSP*

Magazine, 1987, pp. 4-23.

[34] R. P. Lippmann, Phys. Rev. D, 45 (1992) 4088.

[35] S.J. Martin, A.J. Ricco, T.M. Niemczyk, G.C. Frye, Characterization of SH acoustic plate mode liquid sensors, Sensors and Actuators, Volume 20, Issue 3, 1 December 1989, pp. 253-268

[36] V. Raimbault, D. Rebi3re, C. Dejous, A microfluidic surface acoustic wave sensor platform: Application to high viscosity measurements, Materials Science and Engineering: C, Volume 28, Issues 5–6, 1 July 2008, pp. 759-764.

[37] Kerstin L3nge, Guido Blaess, Achim Voigt, Reiner G3tzen, Michael Rapp, Integration of a surface acoustic wave biosensor in a microfluidic polymer chip, Biosensors and Bioelectronics, Volume 22, Issue 2, 15 August 2006, pp. 227-232.

CAPÍTULO 5

DETECCIÓN DE SIMULANTES DE AGENTES DE GUERRA QUÍMICA

5.1. Introducción

Los agentes de guerra química son sustancias que se utilizan para matar, lesionar o incapacitar a personas a través de sus propiedades tóxicas. En el segundo capítulo se han presentado diferentes tipos de agentes de guerra química y sus consecuencias sobre la salud humana, que se ve comprometida por la exposición a cada uno de ellos. Esta es la razón por la que en este estudio se utilizan sus bien conocidos simulantes, que aunque su exposición podría ser perjudicial para la salud en algún caso, sus efectos no tienen comparación con los causados por los agentes de guerra química reales.

5.2. Simulantes de agentes de guerra química

En la Tabla 5.1 se recogen los agentes de guerra química que se han seleccionado como representantes significativos del conjunto de los CWA mostrados en la Tabla 2.1. En ellos se ha basado la validación de los diferentes arrays de sensores desarrollados en este trabajo.

Cada agente de guerra química tiene uno o varios simulantes, que son asignados teniendo en cuenta que mimetizan las propiedades físicas y químicas del agente real pero no tienen asociadas sus propiedades toxicológicas. Esto va a permitir poner a prueba los arrays de sensores en el laboratorio sin asumir el riesgo que supone trabajar con los agentes de guerra química reales. Los simulantes encontrados en la bibliografía [1,2,3] para los CWAs se muestran en la Tabla 5.2. El LCt_{50} es el parámetro para los agentes de guerra química que se ha tomado como referencia para la elección de las

concentraciones a medir. Así, se deben detectar concentraciones menores que esta referencia para que el sistema de detección tenga utilidad, de este modo existe un intervalo de tiempo, para aplicar las medidas de seguridad correspondientes antes de que se produzcan víctimas mortales. Las unidades se han pasado a ppm·minuto para que la relación con la concentración de los simulantes sea directa.

Tabla 5.1. Agentes de guerra química seleccionados para su detección y su dosis letal media (LCt₅₀).

Tipo de Agente de Guerra Química	Agente	Abreviatura	LCt₅₀ (mg·min·m⁻³)
Nervioso	Sarín	GB	50-100
Vesicante	Gas Mostaza	HD	500-1500
	Mostaza Nitrogenada	HN	1000-3000
Pulmonar	Fosgeno	CG	1800-3200

Tabla 5.2. Simulantes de los CWA a detectar y sus dosis letales medias que marcarán el límite de concentración a la que hay que medir dichos simulantes.

Simulante	Fórmula	CWA	LCt₅₀ (ppm·minuto)
Dimetil metilfosfanato (DMMP)	C ₃ H ₉ O ₃ P	Sarín (GB)	18
Dipropilenglicol monometil éter (DPGME)	C ₇ H ₁₆ O ₃	Mostaza Nitrogenada (HN)	180
N,N-Dimetilacetamida (DMA)	C ₄ H ₉ NO	Mostaza Destilada (HD)	140
1,5-Dicloropentano (DCP)	C ₅ H ₁₀ Cl ₂	Mostaza Destilada (HD)	140
1,2-Dicloroetano (DCE)	C ₂ H ₄ Cl ₂	Mostaza Destilada (HD)	140
Dichloromethane (DCM)	CH ₂ Cl ₂	Fosgeno (CG)	800

5.3. Polímeros como materiales sensibles

En el capítulo anterior se han desarrollado los dispositivos SAW, pero para obtener un sensor se depositan en la superficie de los dispositivos diferentes materiales en forma de una capa delgada, denominada capa sensible. En estos materiales sucede un cambio de la densidad superficial cuando son adsorbidos los volátiles, de forma que el cambio de masa en la superficie del sensor causa un desplazamiento de la frecuencia de resonancia del oscilador.

La principal propiedad requerida para el uso de un material como capa sensible es que la adsorción de volátiles en el material se produzca mediante fisisorción, permitiendo de este modo un proceso reversible de desorción de los volátiles. Los materiales más comunes que se utilizan son polímeros en fase amorfa y gomosa (sin polimerizar), puesto que la adsorción de volátiles es reversible. Por otra parte existe una gran variedad de polímeros disponibles comercialmente, pudiendo elegir los más adecuados para los compuestos volátiles a detectar.

5.3.1. Técnicas de depósito de capas sensibles

Se han utilizado dos técnicas diferentes para el depósito de los polímeros como capas sensibles (Fig. 5.1): espray y “spinning”.

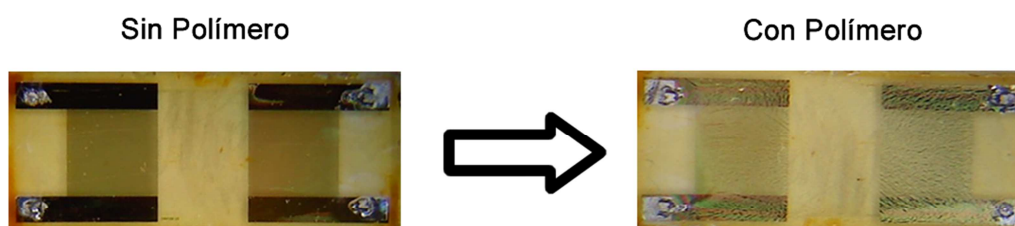


Figura 5.1. Ejemplos de un dispositivo SAW antes y después de ser depositado, por “spinning”, un polímero como capa sensible.

5.3.1.1. Depósito de polímeros por spray

El polímero se disuelve en un disolvente orgánico y se deposita sobre la superficie mediante un aerógrafo, que utiliza nitrógeno como gas de arrastre para evitar la contaminación (Fig. 5.2). Los disolventes orgánicos utilizados tienen una alta presión de vapor y por tanto se vaporizan muy rápido, sin llegar a formar gotas en la superficie del sensor. Las principales características de esta técnica son:

- El desplazamiento de la frecuencia de resonancia debido a la masa de la capa de polímero depositado se puede monitorizar en tiempo real, mediante un analizador de espectros o contador de frecuencias, permitiendo conocer el espesor de la capa sensible en todo momento. Como son sensores másicos, el cambio de la frecuencia de resonancia es proporcional al espesor de la capa sensible y es dado en kHz. En el caso de los RSAW se calcula el espesor de la capa depositada mediante la ecuación 3-21.
- La reproducibilidad del sistema se basa en que el espesor de la capa sensible sea siempre el mismo. Un parámetro importante es la atenuación de la onda acústica, que aumenta siempre que lo hace el espesor de la capa sensible. Para algunos materiales la capa sensible produce pérdidas tan altas que se llega a la inutilización del dispositivo cuando se alcanza determinado espesor.



Figura 5.2. Depósito de polímero mediante la técnica de spray.

5.3.1.2. Depósito de polímeros por “spinning”

El “spinning” es un procedimiento de depósito en el cual se vierte la disolución del polímero y el solvente orgánico sobre el dispositivo y se centrifuga durante un tiempo dado a una velocidad determinada (Fig. 5.3). Las principales características de este método son:

- Para depositar un determinado espesor de un polímero se requiere encontrar los parámetros adecuados que son: concentración del polímero en la disolución, velocidad (revoluciones por minuto, rpm), aceleración ($\text{rpm} \cdot \text{s}^{-1}$), y temperatura. Una vez fijados los parámetros se obtienen capas muy similares entre diferentes procesos y dispositivos, siendo una técnica muy rápida, sencilla, y además es muy repetitiva.
- Esta técnica aporta una gran homogeneidad a la capa sensible.



Figura 5.3. Imagen del “spinner” utilizado para el depósito de polímeros como capa sensible.

5.3.2. Comparación entre dispositivos con respecto a la sensibilidad másica

Aprovechando la reproducibilidad del “spinning” se ha supuesto que la capa resultante de un polímero, como el denominado poliepiclorohidrina (PECH), tiene iguales propiedades al depositarlo sobre los tres dispositivos (RSAW, Love-Novolac y Love-SiO₂), siempre y cuando en el proceso se utilicen los mismos parámetros. Esta particularidad del “spinning” se ha utilizado para conocer la sensibilidad de los dispositivos Love, tomando como referencia un dispositivo RSAW. Se ha encontrado que para una disolución de PECH (0.161 g de PECH en 14 ml de acetona) depositada a 4000 rpm durante 30 s, el desplazamiento de frecuencia es aproximadamente 300 kHz. Los espesores se caracterizan mediante la respuesta en frecuencia antes y después del depósito del polímero (Fig. 5.4 y 5.5), de esta forma es posible ver el desplazamiento en frecuencia de la fase con valor cero (Fig. 5.6).

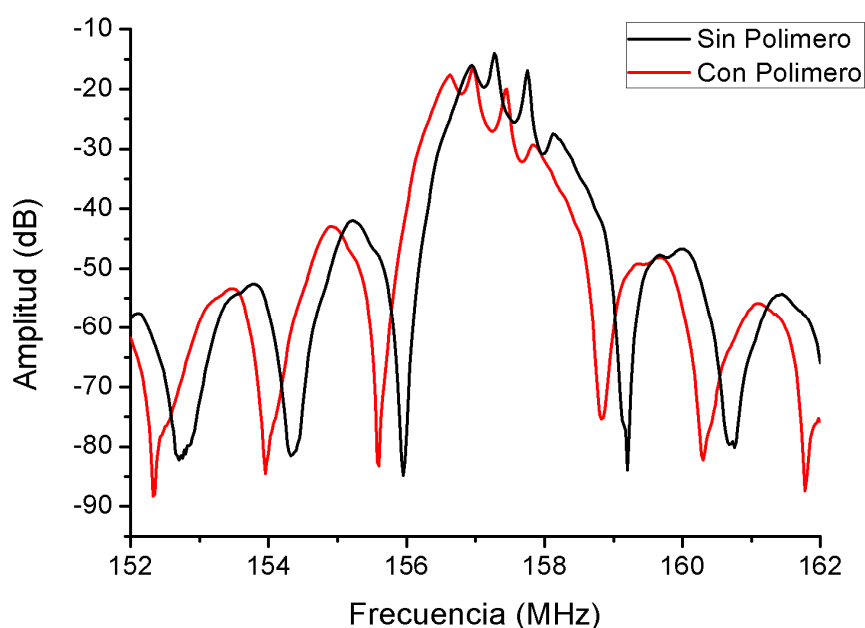


Figura 5.4. Desplazamiento en frecuencia de la amplitud para un dispositivo RSAW debido al depósito de la capa de PECH.

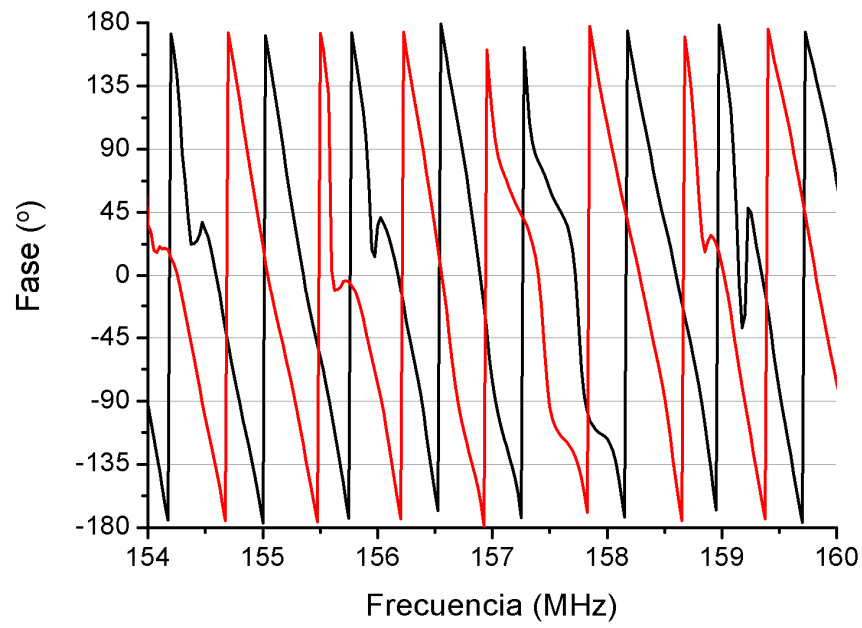


Figura 5.5. Desplazamiento en frecuencia de la fase para un dispositivo RSAW debido al depósito de la capa de PECH.

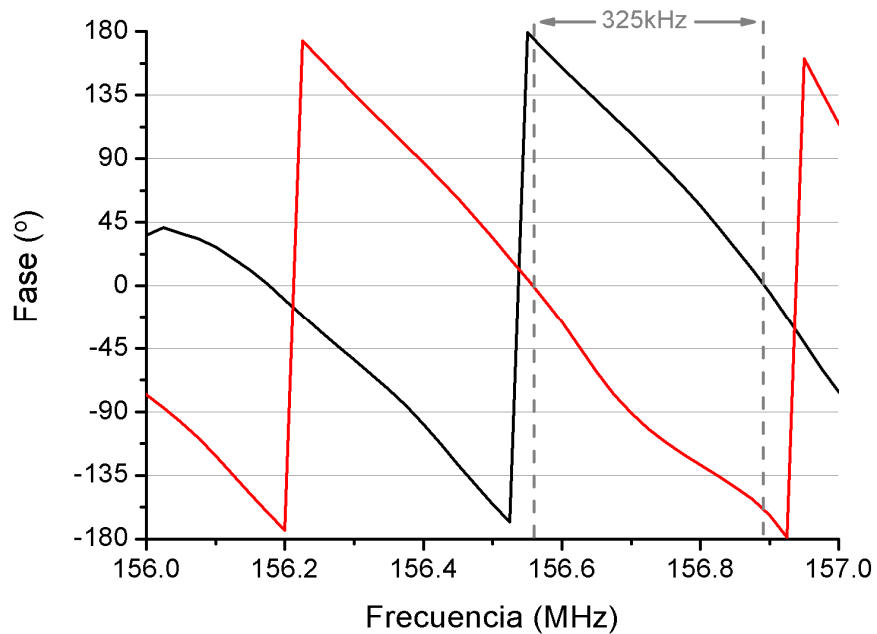


Figura 5.6. Medida del desplazamiento en frecuencia de la fase con valor cero para un RSAW debido al depósito de la capa de PECH.

De este mismo modo y bajo los mismos parámetros la disolución de PECH ha sido depositada sobre los dispositivos Love y los resultados han sido los siguientes (Fig. 5.7, 5.8, 5.9, 5.10, 5.11 y 5.12):

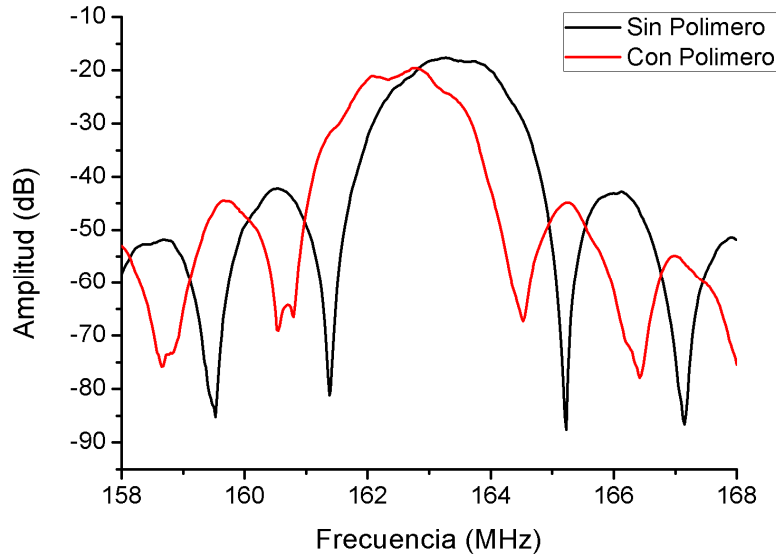


Figura 5.7. Desplazamiento en frecuencia de la amplitud para un dispositivo Love (Cuarzo/SiO₂) debido al depósito de la capa de PECH.

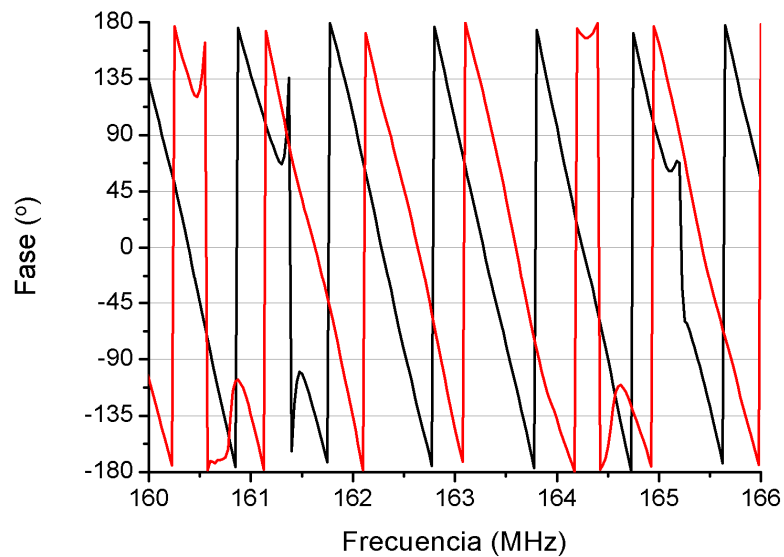


Figura 5.8. Desplazamiento en frecuencia de la fase para un dispositivo Love (Cuarzo/SiO₂) debido al depósito de la capa de PECH.

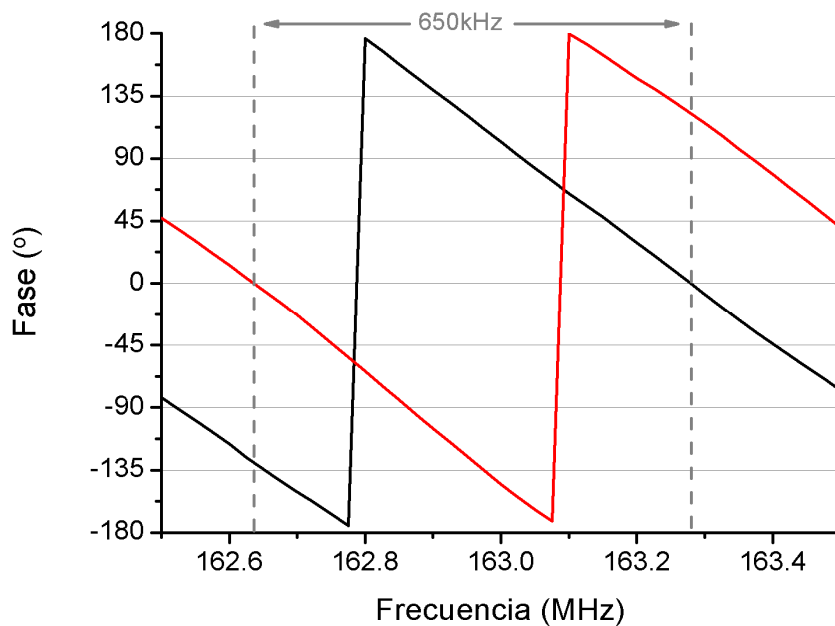


Figura 5.9. Medida del desplazamiento en frecuencia de la fase con valor cero para un dispositivo Love (Cuarzo/SiO₂) debido al depósito de la capa de PECH.

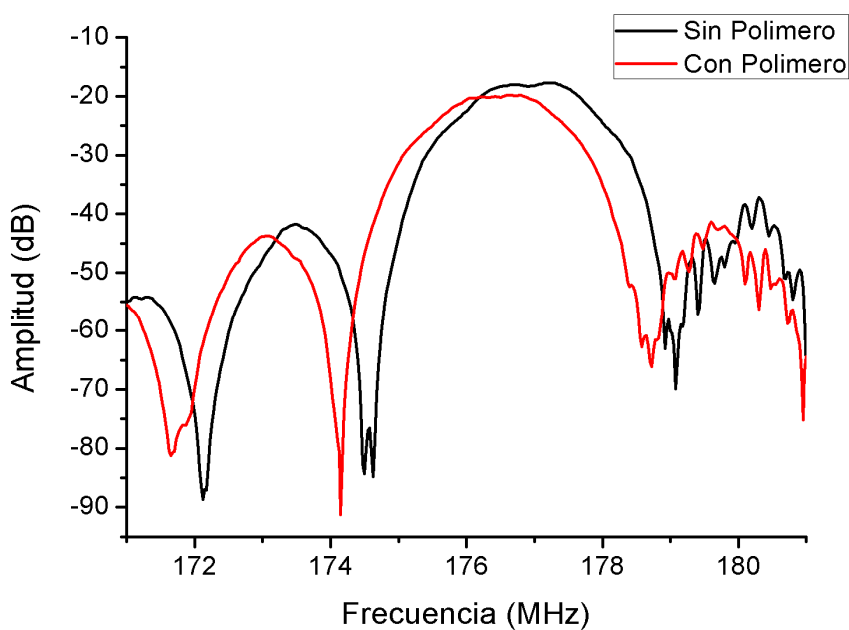


Figura 5.10. Desplazamiento en frecuencia de la amplitud para un dispositivo Love (Cuarzo/Novolac) debido al depósito de la capa de PECH.

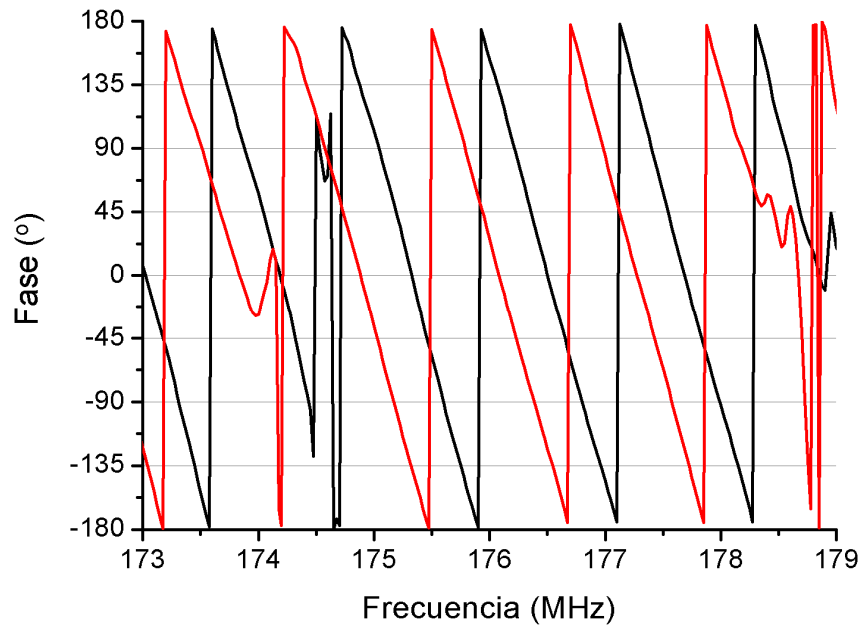


Figura 5.11. Desplazamiento en frecuencia de la fase para un dispositivo Love (Cuarzo/Novolac) debido al depósito de la capa de PECH.

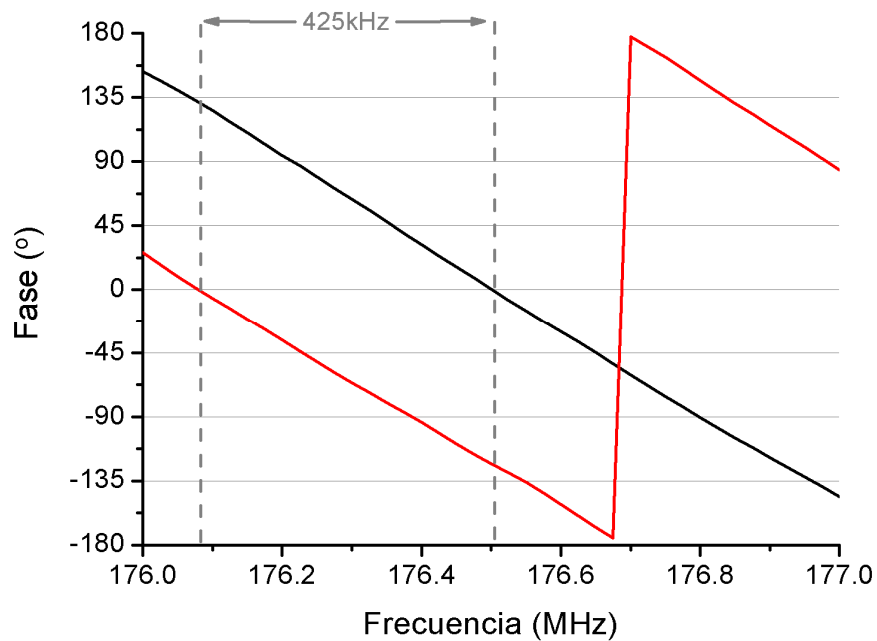


Figura 5.12. Medida del desplazamiento en frecuencia de la fase con valor cero para un dispositivo Love (Cuarzo/Novolac) debido al depósito de la capa de PECH.

Los resultados de las figuras anteriores muestran los diferentes valores, para el desplazamiento en frecuencia de la amplitud y de la fase para cada uno de los

dispositivos utilizados en este trabajo, al depositar la misma capa de polímero. En el caso del RSAW el desplazamiento de frecuencia correspondiente es 325 kHz, en el caso del Love Cuarzo/SiO₂ el desplazamiento de frecuencia corresponde a 650 kHz, y en el caso del Cuarzo/Novolac corresponde a 425 kHz.

A partir de la ecuación 3-21 se ha calculado que la densidad de masa superficial de la capa de PECH depositada es $108 \cdot 10^{-6} \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-2}$ y aplicando la ecuación 4-1, se obtiene la sensibilidad másica para cada dispositivo. Siendo para el dispositivo RSAW $19.1 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$, para el dispositivo Love Cuarzo/SiO₂ $36.8 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$, y en el caso del Cuarzo/Novolac $22.3 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$.

5.4. Arrays de sensores másicos

Las capas sensibles elegidas son recubrimientos de un polímero determinado con un espesor aproximado de 100 nm. Este espesor se calcula mediante el cambio de frecuencia del dispositivo antes y después del depósito de polímero. El dispositivo RSAW es el único dispositivo para el que se conoce la relación entre el desplazamiento de frecuencia y la masa de polímero depositada (ecuación 3-21). De esta forma si se tiene un material con densidad $1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, para un desplazamiento de frecuencia de 291 kHz se obtiene un espesor de 100 nm. Al depositar el polímero se debe tener en cuenta que parte de la energía de la onda es absorbida por éste, y su amplitud se ve atenuada. Por tanto además del desplazamiento de frecuencia (espesor) debemos controlar la amplitud. Como la atenuación que producen algunos polímeros es grande, en algunos casos no se podrá llegar a depositar el espesor deseado de la capa sensible.

5.4.1. Array 1 de sensores RSAW - Basado en bibliografía

En primer lugar para el desarrollo de un sistema de detección de agentes de guerra química se ha realizado un estudio bibliográfico para elegir las diferentes capas sensibles [3] que formen un array de sensores capaz de detectar y clasificar los diferentes compuestos utilizados como simulantes de agentes de guerra química. En la Tabla 5.3 se muestran los espesores obtenidos con los polímeros y disolventes elegidos para depositar las capas sensibles mediante spray.

Tabla 5.3. Sensores que forman el Array 1.

Sensor	Polímero	Fórmula Empírica	Disolvente	Espesor (kHz)
S0	Referencia			-
S1	PECH (Poliepiclorohidrina) (0.05 g)	$[\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}]_n$	Acetona (40 ml)	300
S2	Colodión (0.2 g)	$(\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_{38})_n$	Etanol (30 ml)	300
S3	PVP (Polivinilpirrolidona) (0.2 g)	$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$	Cloroformo (40 ml)	300
S4	PEI (Polietilenimina) (0.2 g)	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{N})_n$	Etanol (40 ml)	300
S5	PAA (Ácido poliacrílico) (0.2 g)	$(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$	Cloroformo (40 ml)	300
S6	PEUT (Polieteruretano) (0.1 g)	$[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_2-$ $(\text{C}_8\text{H}_{32}\text{O})_m]_n$	Diclorometano (40 ml)	300
S7	PIB (Poliisobutileno) (0.05 g)	$(\text{C}_4\text{H}_8)_n$	Tolueno (40 ml)	300

El array se ha caracterizado midiendo diferentes concentraciones de cada simulante (Tabla 5.4), dentro del rango de concentraciones que nos permite nuestro montaje experimental y en base a los LCt_{50} :

Tabla 5.4. Concentraciones medidas por el Array 1 para cada uno de los compuestos.

Simulante de CWA	Concentraciones medidas (ppm)
DMMP	0.1, 0.5, 1, 5, 10
DPGME	0.5, 1, 5, 10, 50
DCP	5, 10, 30, 50, 80, 100
DMA	30, 50, 80, 100, 150, 200
DCE	100, 200
TOLUENO	50, 80, 100, 150, 200

Como ejemplo significativo se muestra la respuesta en tiempo real de un sensor RSAW recubierto con PECH (S1) como capa sensible, para diferentes concentraciones de DMMP (Fig. 5.13).

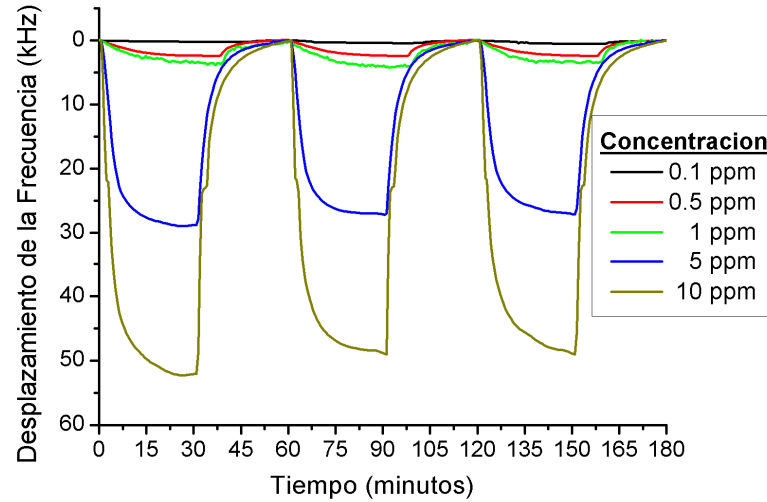


Figura 5.13. Respuesta en tiempo real de un sensor RSAW (S1), para diferentes concentraciones de DMMP.

Como se aprecia en la figura anterior existe una relación lineal entre la concentración de DMMP y el desplazamiento de la frecuencia, lo que es muy importante para la calibración de estos sensores que configuran el array. Este comportamiento se extiende al resto de los sensores del array (Fig. 5.14).

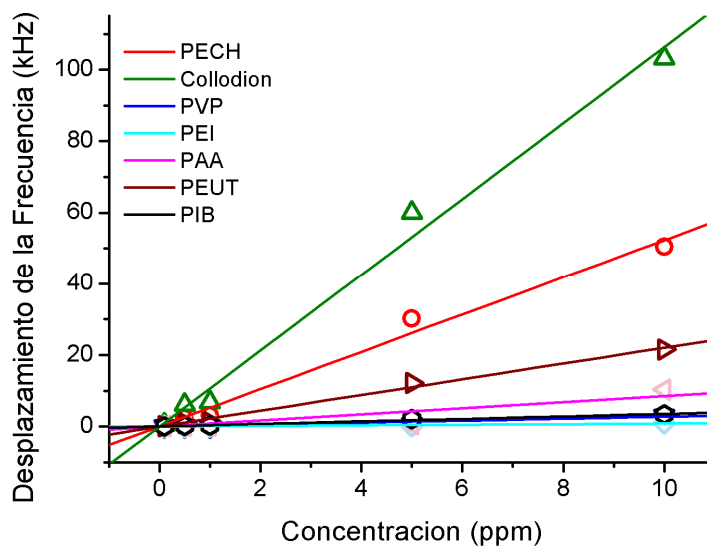


Figura 5.14. Relación lineal entre el desplazamiento de frecuencia y las concentraciones medidas para DMMP por el Array 1.

Las diferentes respuestas ($\text{kHz} \cdot \text{ppm}^{-1}$) de los sensores a cada uno de los simulantes se han calculado y representado en un diagrama radial (Fig. 5.15). Se observa una huella característica para cada uno de los simulantes, que sirve como una diferenciación visual preliminar.

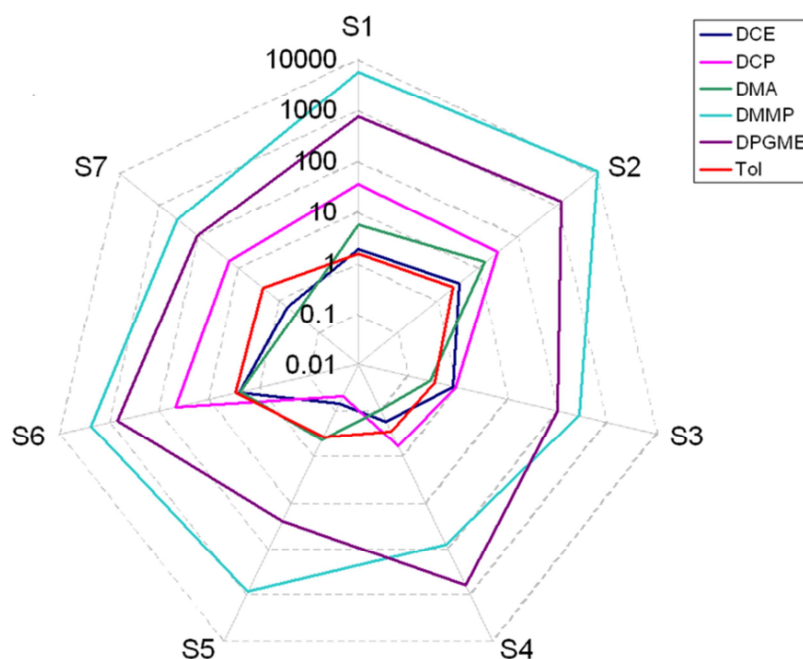


Figura 5.15. Huella característica para cada uno de las simulantes de CWA, utilizando las respuestas de cada uno de los sensores del Array 1.

El máximo desplazamiento de la frecuencia durante el tiempo de exposición se ha normalizado a la concentración y un análisis de componentes principales (PCA) se ha aplicado a estos datos para obtener las componentes principales. Las más importantes de estas componentes (PC1 y PC2) se han representado en la Figura 5.16. Los resultados permiten una visualización en dos dimensiones de los datos más relevantes, que muestran una discriminación de los simulantes de los CWA a través de las elipses que contienen a cada conjunto. La dispersión de los puntos es consecuencia de la variación en el desplazamiento de la frecuencia de resonancia según la concentración detectada.

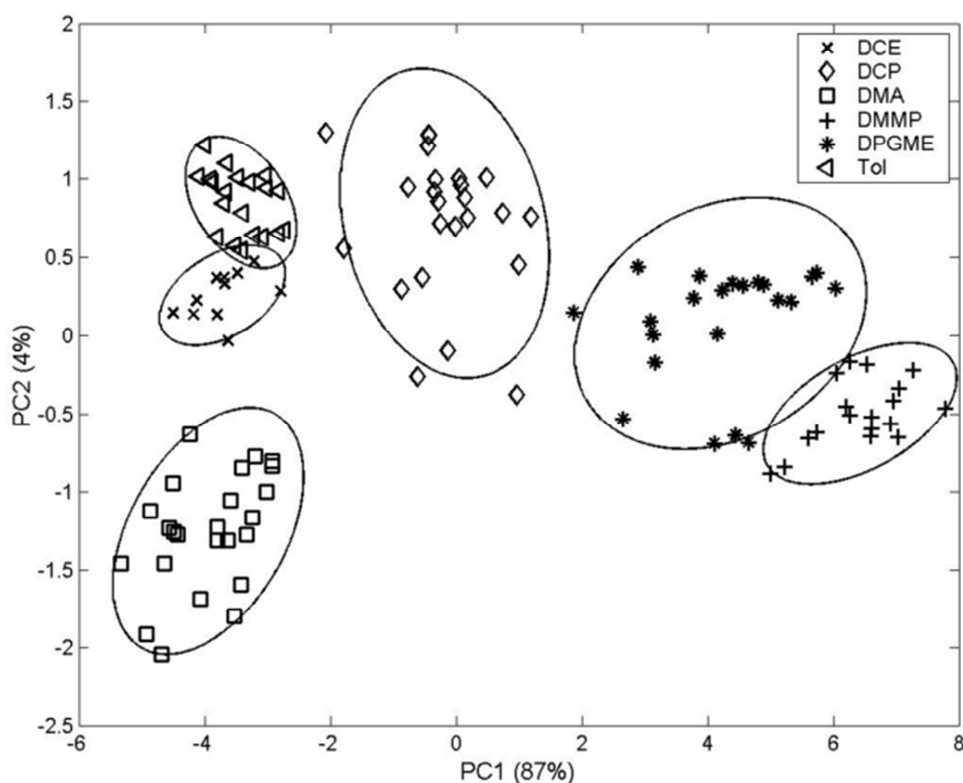


Figura 5.16. Representación de las componentes principales PC1 y PC2 para el Array 1.

Se puede ver como las elipses correspondientes a las distintas concentraciones de DMMP y DPGME se superponen parcialmente al igual que las del DCE y TOL; esto puede llevar a la clasificación errónea de alguna medida que se encuentre en la zona de interferencia. Las componentes principales PC1, PC2 y PC3 se han utilizado para entrenar una red neuronal probabilística (PNN) con la que se han clasificado los simulantes CWA obteniendo un 95% de aciertos (Fig. 5.17). Efectivamente se ha clasificado una medida de DMMP como si fuese DPGME y también se ha fallado al clasificar las medidas de DCE y TOL, que en algunos casos se han confundido entre ambos compuestos.

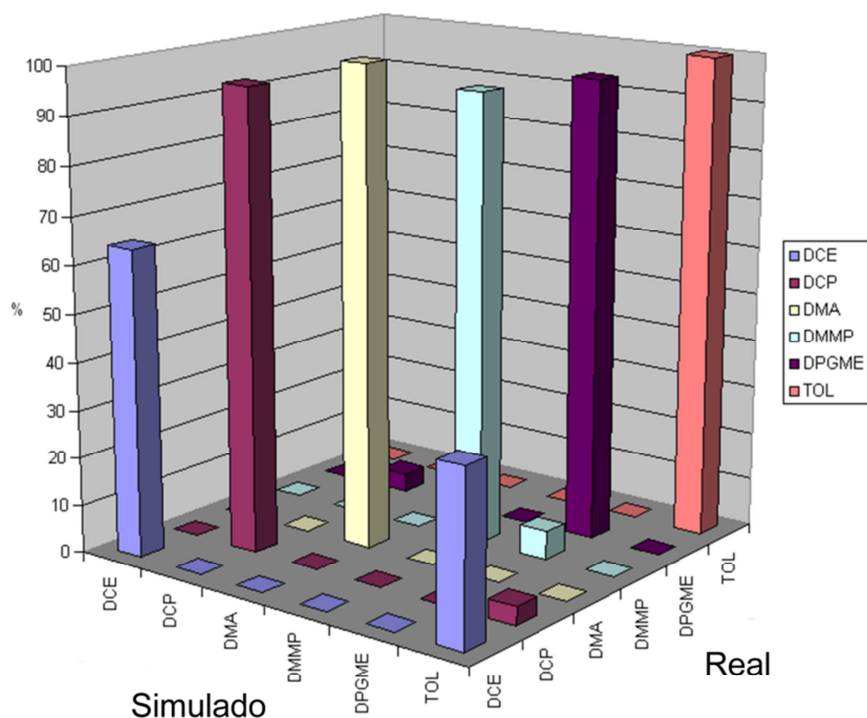


Figura 5.17. Resultados obtenidos al aplicar una PNN a los datos obtenidos del Array 1.

5.4.2. Array 2 de sensores RSAW - Basado en la aplicación de la ecuación LSER

Se ha utilizado la ecuación LSER (Linear Solvation Energy Relationships) para elegir los polímeros óptimos para la detección de los diferentes compuestos que simulan a los CWA.

Los sensores de gases basados en dispositivos RSAW y Love detectan compuestos volátiles mediante el desplazamiento de la frecuencia de oscilación por el cambio de la densidad de masa superficial producido por la concentración de volátiles adsorbidos en la fase polimérica que constituye la capa sensible, C_s . Esta concentración está directamente relacionada con la concentración de volátiles en fase gaseosa, C_v , mediante el coeficiente de partición, K . Este coeficiente de partición depende tanto de las propiedades del polímero como de las propiedades del compuesto en fase vapor.

$$K = \frac{C_s}{C_v} \quad (5-1)$$

El coeficiente de partición para cada caso (simulante de CWA y polímero) puede ser calculado [4] mediante la ecuación LSER:

$$\log K = c + rR_2 + s\pi_2^* + a\alpha_2^H + b\beta_2^H + l \cdot \log L^{16} \quad (5-2)$$

donde $R_2, \pi_2^*, \alpha_2^H, \beta_2^H$ y L^{16} son los llamados parámetros de solvatación del vapor, que caracterizan las propiedades de solubilidad del vapor, y r, s, a, b y l son los parámetros que caracterizan las propiedades de solubilidad del polímero. La constante c corresponde a un término independiente obtenido de múltiples regresiones lineales usadas para determinar los coeficientes de la ecuación LSER, los cuales se obtienen empíricamente (por tanto pueden variar ligeramente de un autor a otro).

El cambio de masa, Δm , debido a los volátiles adsorbidos en el volumen de la fase polimérica, V_f , se obtiene a través de:

$$\Delta m = C_s \cdot V_f = K \cdot C_v \cdot V_f \quad (5-3)$$

Por tanto el desplazamiento de frecuencia de oscilación para cada sensor dependerá de la concentración de volátiles en fase gaseosa y del coeficiente de partición, relacionado con el compuesto volátil a detectar y con el polímero que actúa como capa sensible:

$$\Delta f = \sim K \cdot C_v \quad (5-4)$$

Los parámetros de la ecuación LSER para los compuestos DCE, DCM, DMA, TOL y DMMP (Tabla 5.5) en fase vapor, han sido dados por diversos autores [5,6], al igual que los parámetros de solubilidad de muchos de los polímeros utilizados como capa sensible en sensores [7,8,9], aunque solo unos pocos se encuentran disponibles comercialmente (Tabla 5.6).

Tabla 5.5. Parámetros tabulados para la ecuación LSER de los simulantes encontrados en bibliografía.

Simulante	R_2	π_2^*	α_2^H	β_2^H	$\log L^{16}$
DCM	0.39	0.57	0.10	0.05	2.02
DCE	0.42	0.64	0.10	0.11	2.57
DMMP	0.22	0.83	0.00	0.81	3.98
Tol	0.60	0.52	0.00	0.14	3.32
DMA	0.36	1.33	0.00	0.78	3.72

Tabla 5.6. Parámetros tabulados para la ecuación LSER de los polímeros encontrados en bibliografía.

Polímero	c	Polarizabilidad (r)	Polaridad (s)	Basicidad (a)	Acidez (b)	Dispersión (l)
PIB	-0.77	-0.08	0.37	0.18	0	1.02
PECH	-0.75	0.10	1.63	1.45	0.71	0.83
OV25	-0.85	0.18	1.29	0.56	0.44	0.88
OV202	-0.39	-0.48	1.30	0.44	0.70	0.81
PVPR	-0.57	0.67	0.83	2.25	1.03	0.72
PVTD	-0.59	-0.02	0.74	2.44	0.22	0.92
PEM	-1.65	-1.03	2.75	4.23	0.00	0.86
SXCN	-1.63	0.00	2.28	3.03	0.52	0.77
PEI	-1.58	0.49	1.52	7.02	0.00	0.77
SXPYR	-1.94	-0.19	2.42	6.78	0.00	1.02
PDMS	-0.12	0.02	1.65	2.71	0.38	0.72
PMPS	-0.20	-0.03	0.97	1.11	0.10	0.86
PMAPS	-0.01	-0.23	0.97	1.99	0.24	0.83
PMiPCAS	0.13	-0.16	0.79	2.36	0.28	0.77
CSVAL	0.02	0.05	0.23	2.22	0.46	0.85
PMTFPS	-0.34	-0.76	1.44	0.11	1.22	0.72
PCPMS	-2.58	0.17	1.48	2.00	0.69	0.67
SXPHB	-0.85	0.18	1.29	0.56	0.44	0.89
Carbowax	-2.01	0.25	1.26	2.07	0.00	0.43

Por tanto por la ecuación LSER es posible hacer una valoración de los polímeros más adecuados para formar un array de sensores que detecten y discriminen los simulantes que se han elegido como objetivo y cuyos parámetros están tabulado.

Si consideramos “m” simulantes y “n” polímeros, cada polímero “n” puede ser posicionado en un espacio vectorial de dimensión “m” mediante el coeficiente de partición, en el cual cada eje corresponde a un simulante y por tanto la posición viene definida por $(K_1^n, K_2^n, \dots, K_m^n)$. En este caso se tiene un espacio de dimensión 5 y

posicionaremos 19 polímeros. Para simplificar se muestra un ejemplo para 3 simulantes y cinco polímeros en la Figura 5.18.

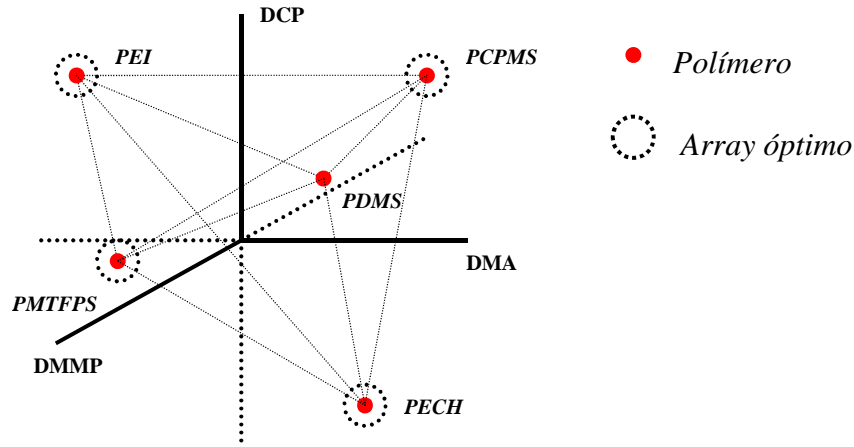


Figura 5.18. Ejemplo de posicionamiento de los polímeros en el espacio de los simulantes.

Un eficiente sistema de detección de volátiles requiere una alta sensibilidad y selectividad. Una alta sensibilidad significa un notable desplazamiento de la frecuencia de resonancia para bajas concentraciones de volátiles, y una alta selectividad significa un comportamiento diferenciado de los sensores que forman el array ante los diferentes compuestos volátiles, lo que permite diseñar patrones de reconocimiento y aplicarlos.

El array óptimo tiene sus polímeros posicionados lejos unos de los otros en el ya mencionado espacio de los simulantes. Debido a una gran diferencia entre los órdenes de magnitud de los parámetros de vapor, algunos simulantes pueden obtener una posición privilegiada en el proceso de optimización. Para evitar esta posible falta de selectividad hacia algunos de los simulantes, se han normalizado los ejes y de esta forma el espacio cambia la forma de K a K^* :

$$K_m^{*n} = \frac{K_m^n}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (K_m^i)^2}} \quad (5-5)$$

Un array de seis polímeros que maximiza la distancia entre ellos en el espacio de las K^* , es el siguiente (Tabla 5.7):

Tabla 5.7. Polímeros seleccionados como óptimos para formar un array que detecte los simulantes de CWAs elegidos.

Polímero	Fórmula Empírica	Disolvente
PMTFPS (Metiltrifluoropropilsiloxano - dimetilsiloxano)	$\text{CH}_3\text{SiO}(\text{SiOC}_2\text{H}_5)_m\text{-(SiOC}_4\text{H}_9\text{F}_3)_n\text{SiCH}_3$	Diclorometano
CW (Carbowax)	$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	Etanol
PEI (Polietilenimina)	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{N})_n$	Etanol
PECH (Poliepiclorhidrina)	$[\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2\text{O}]_n$	Acetona
PDMS (Polidimetilsiloxano)	$(\text{C}_2\text{H}_6\text{OSi})_n$	Hexano
PCPMS (Policianopropilmetilsiloxano)	$(\text{C}_4\text{H}_{13}\text{ClO}_2\text{Si}_2)_n$	Diclorometano

Una vez encontrados los polímeros mediante el estudio teórico, fueron depositados por espray como capas sensibles, formando el siguiente array de sensores (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Disposición de sensores que forman el Array 2.

Sensor	Polímero	Disolvente	Espesor (kHz)
S0	Reference		-
S1	PCPMS (0.1 g)	Diclorometano (50 ml)	150
S2	PECH (0.05 g)	Acetona (40 ml)	300
S3	CW (0.1 g)	Cloroformo (50 ml)	200
S4	PDMS (0.1 g)	Diclorometano (50 ml)	300
S5	PEI (0.2 g)	Etanol(40 ml)	300
S6	PMTFPS (0.1 g)	Diclorometano (50 ml)	250

A continuación se midieron diversas concentraciones de cada uno de los simulantes (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Concentraciones medidas por el Array 2 para cada uno de los compuestos seleccionados.

Simulante	Concentraciones testadas (ppm)
DMMP	0.05, 0.1, 0.5, 1
DPGME	0.5, 1, 5, 10
DCP	5, 10, 30, 50, 80, 100
DMA	30, 50, 80, 100, 150, 200
DCE	80, 100, 150, 200
Tolueno	50, 80, 100, 150, 200

Al igual que en el caso del Array 1 se muestra el ejemplo del caso del desplazamiento de la frecuencia de oscilación en tiempo real debido a la interacción del DMMP con el sensor que utiliza PECH (S2) como capa sensible (Fig. 5.19), otros ejemplos se muestran en la referencia [10].

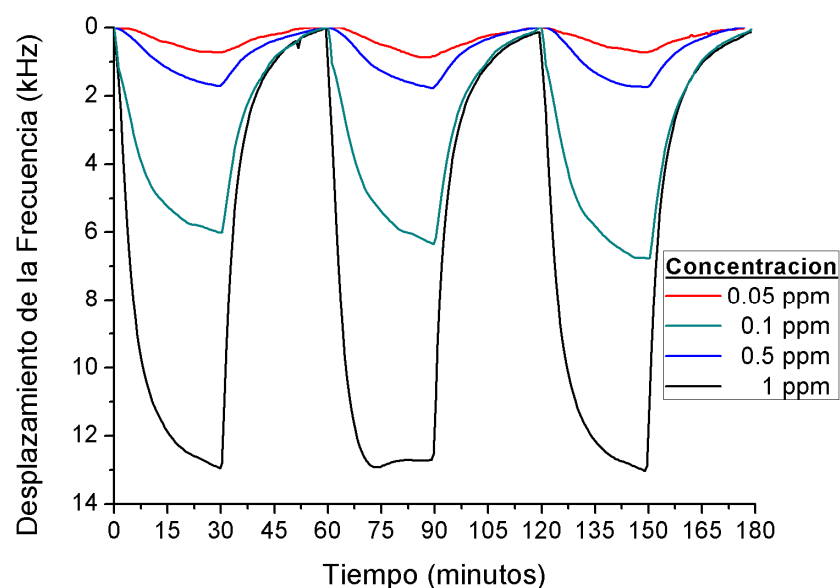


Figura 5.19. Respuesta en tiempo real del sensor S2 del Array 2, para diferentes concentraciones de DMMP.

El desplazamiento de la frecuencia de cada uno de los sensores tiene una buena correlación lineal con la concentración de los diferentes simulantes. Un ejemplo de la respuesta del array para el DMMP se muestra en la Figura 5.20.

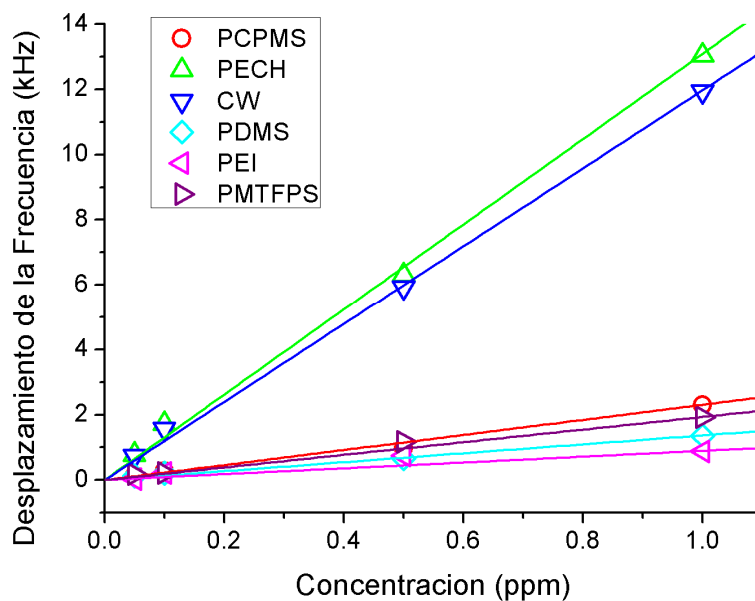


Figura 5.20. Relación lineal entre el desplazamiento de frecuencia y las concentraciones medidas para el DMMP por el Array 2.

La huella formada por el conjunto de respuestas de los sensores del array para cada uno de los simulantes se muestra en la Figura 5.21, donde se aprecia que la huella de cada uno de los simulantes es muy diferente de las de todos los demás. Observándose una buena diferenciación visual.

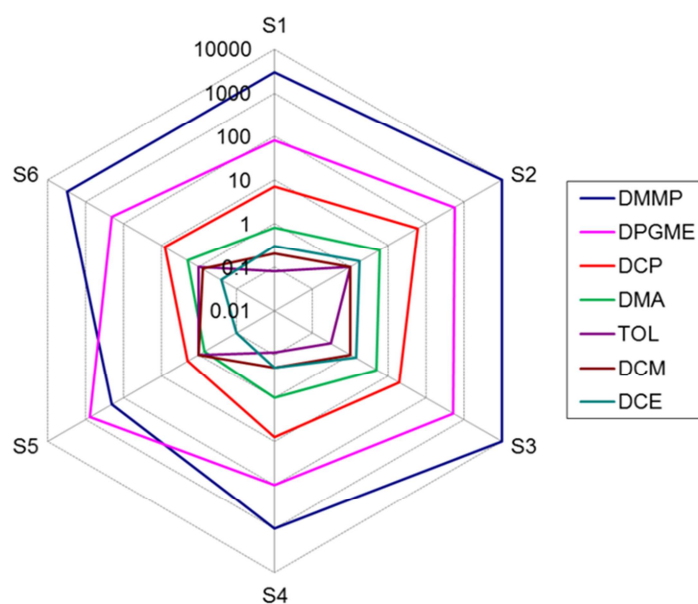


Figura 5.21. Huella característica de cada uno de las simulantes de CWA para cada uno de los sensores del Array 2.

Se han representado las componentes principales PC1 y PC2 resultantes del análisis de PCA (Figura 5.22), mostrando una discriminación entre todos los compuestos menos entre el DCE y DCM, los cuales están superpuestos. Esto probablemente se debe a su parecida composición química.,

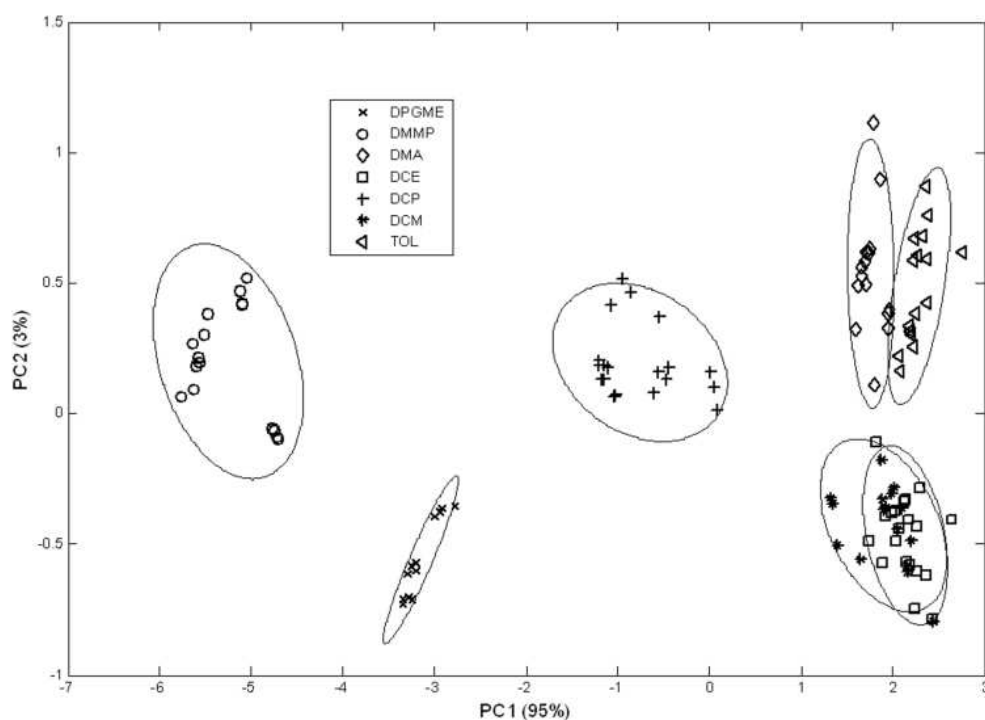


Figura 5.22. Representación de las componentes principales PC1 y PC2 para el Array 2.

Después de aplicar el análisis de componentes principales se han utilizado los tres ejes más representativos para entrenar una PNN y someter a un proceso de clasificación cada una de las medidas, acertando en un 98 % de los casos. Como ya predecía la representación de las componentes principales PC1 y PC2 hay una confusión entre las medidas del DCE y DCM, y por tanto algunas medidas del DCM han sido clasificadas como DCE. Hay que tener en cuenta que en el entrenamiento de la PNN también interviene PC3, por tanto en general, la clasificación será algo mejor que la que se intuye en la representación de dos dimensiones dada por PC1 y PC2 (Fig. 5.23).

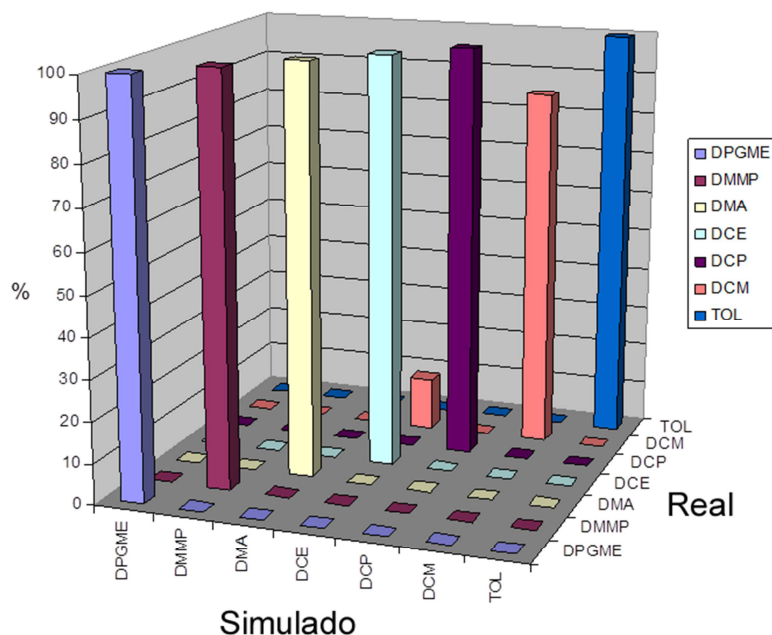


Figura 5.23. Resultados obtenidos al aplicar una PNN a los datos obtenidos del Array 2.

5.4.3. Array 3 de sensores Love (Cuarzo/SiO₂) – Basado en la ecuación LSER

Al igual que en el caso anterior se han utilizado como capas sensibles los polímeros que se han obtenido como óptimos a partir del estudio teórico basado en la ecuación LSER y se ha preparado por spray el Array 3 (Tabla 5.10). La principal diferencia entre el Array 2 y el Array 3 es que este último está formado por dispositivos más sensibles (Love Cuarzo/SiO₂).

Tabla 5.10. Disposición de sensores que forman el Array 3.

Sensor	Polímero	Espesor (kHz)
S0	Referencia	-
S1	PMTFPS	221
S2	CW	170
S3	PEI	400
S4	PECH	600
S5	PDMS	368
S6	PCPMS	200

Este array ha sido caracterizado mediante la medida de las diferentes concentraciones de los simulantes de agentes de guerra química mostrados en la Tabla 5.11.

Tabla 5.11. Concentraciones medidas por el Array 3 para cada uno de los compuestos.

Simulantes	Concentración (ppm)
DMMP	0.04, 0.05, 0.06, 0.08, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1
DPGME	0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 7.5, 10
DMA	15, 25, 50, 75, 125, 150, 175, 200
DCE	75, 100, 125, 200, 250, 300
DCM	125, 150, 175, 200, 225, 250,
DCP	5, 10, 15, 20, 25

Los sensores de este array han mostrado una alta respuesta para los simulantes de CWA. Al igual que en los arrays anteriores, la respuesta en tiempo real para el sensor con capa sensible de PECH (S4) detectando DMMP se muestra como ejemplo (Fig. 5.24). Otros ejemplos para este array pueden ser consultados en la referencia [11].

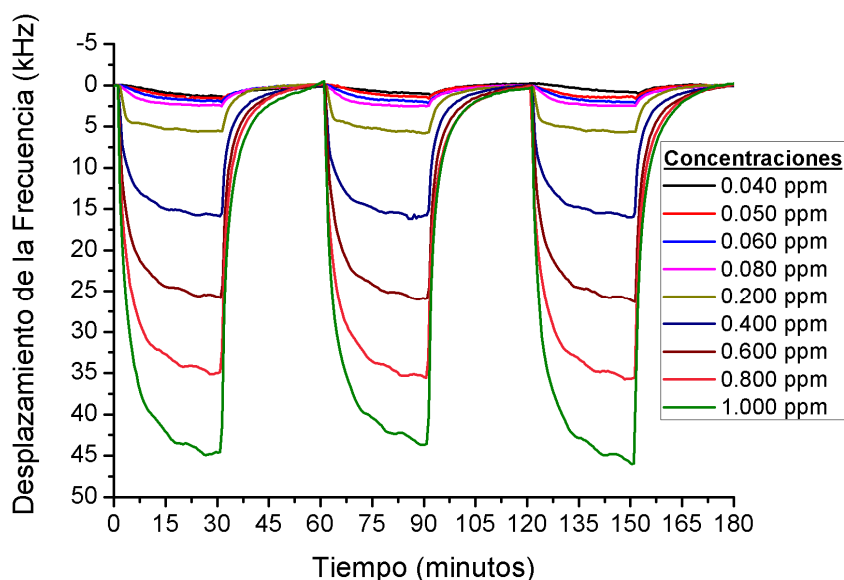


Figura 5.24. Respuesta en tiempo real del dispositivo con capa sensible PECH del Array 3, a diferentes concentraciones de DMMP.

Además cada uno de los sensores ha mostrado una buena correlación lineal entre la concentración del simulante y el desplazamiento de la frecuencia de resonancia (Fig. 5.25).

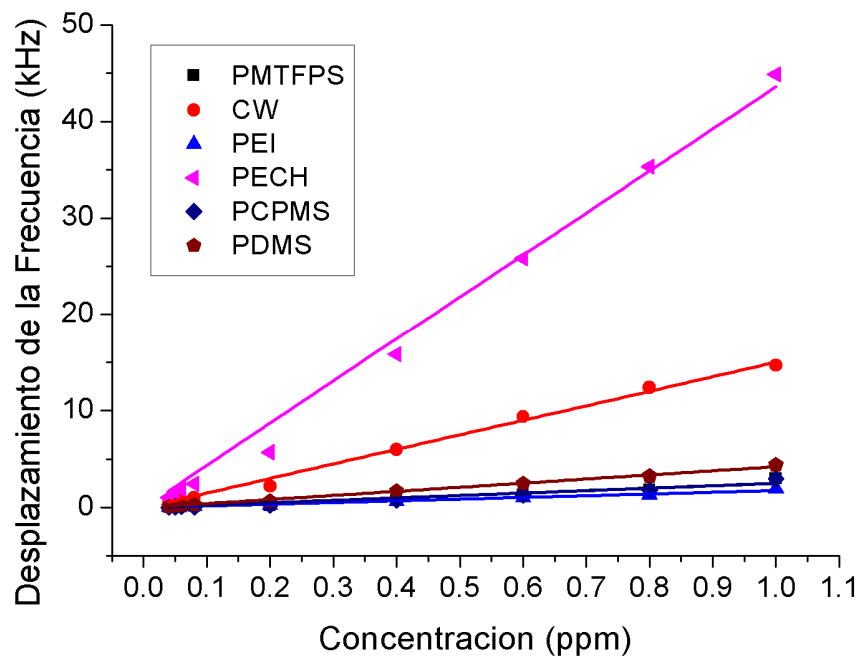


Figura 5.25. Relación lineal entre el desplazamiento de frecuencia y las concentraciones medidas para el DMMP por el Array 3.

Este array también proporciona una huella bien diferenciada para cada uno de los simulantes de los CWAs (Fig. 5.26).

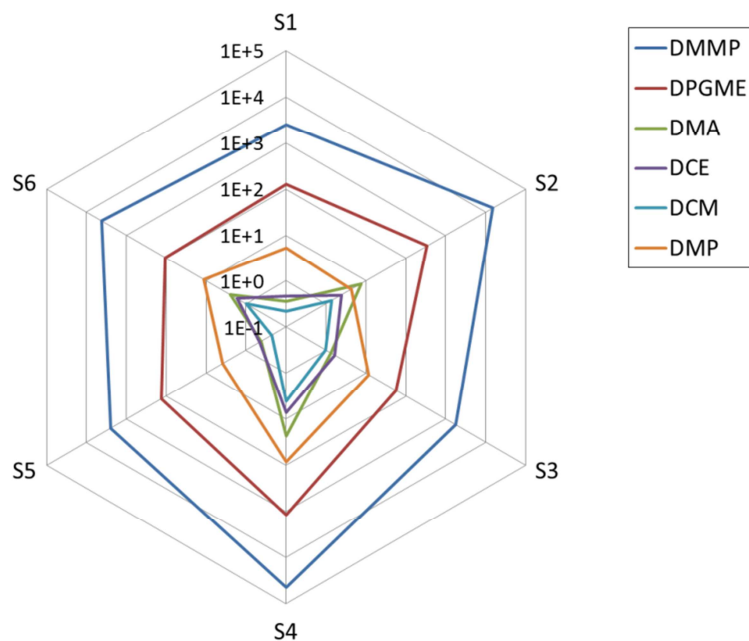


Figura 5.26. Huella característica de cada uno de las simulantes de CWA para cada uno de los sensores del Array 3.

Al aplicar un análisis de componentes principales se aprecia, como para los arrays anteriores, que las dos primeras componentes principales son suficientes para discriminar los compuestos detectados (Fig. 5.27).

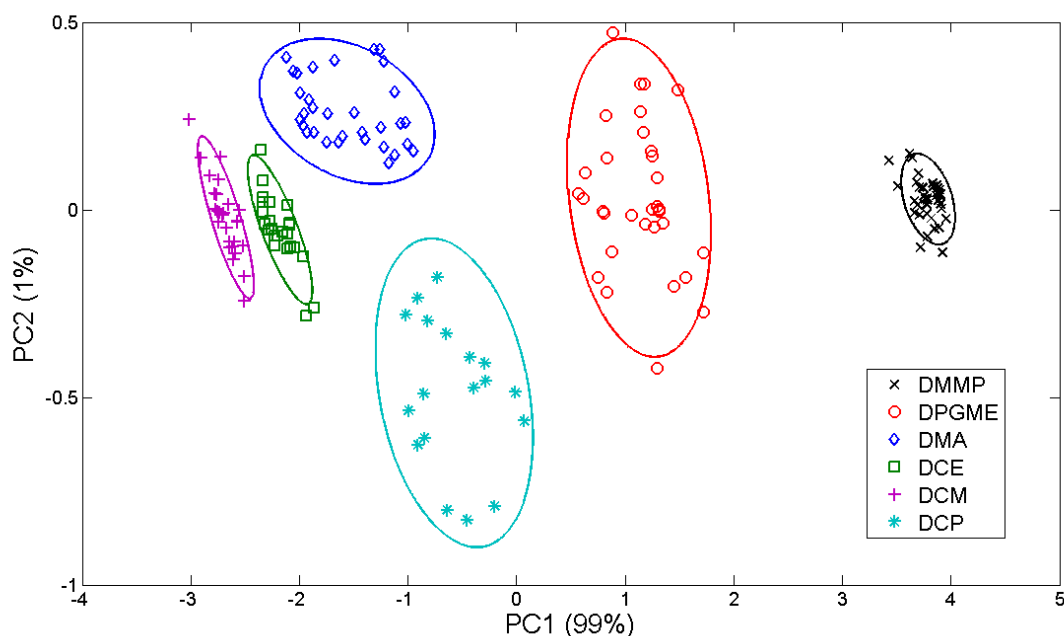


Figura 5.27. Representación de las componentes principales PC1 y PC2 para el Array 3.

Una PNN se ha entrenado para comprobar la correcta clasificación de cada una de las medidas. En el proceso de validación todas las medidas fueron clasificadas correctamente (100% de aciertos).

5.4.4. Array 4 de sensores Love (Cuarzo/Novolac) – Basado en la ecuación LSER

La principal diferencia entre este array y los anteriores es la técnica de depósito de la capa sensible. Mientras que en los casos precedentes los depósitos se han realizado mediante spray, en este array los polímeros se han depositado por “spinning”. La principal razón es que las pequeñas variaciones que se producen de un array a otro cuando se deposita por spray pueden requerir una calibración previa de cada sistema de detección, pero el “spinner” es una técnica con alta reproducibilidad que requeriría solo la calibración de un sistema y esta serviría para el resto de réplicas. Los polímeros y

disolventes utilizados para depositar por “spinning” los diferentes espesores de las capas sensibles del array 4 se muestran en la Tabla 5.12.

Tabla 5.12. Disposición de los sensores que forman el Array 4. Disoluciones utilizadas para el depósito de polímeros mediante el “spinner”.

Sensor	Polímero	Disolvente	Espesor (kHz)
S0	Reference	-	-
S1	PMTFPS (3 g)	Diclorometano (4 ml)	187
S2	PECH (0.161 g)	Acetona (14 ml)	424
S3	PEI (0.362 g)	Etanol (9.4 ml)	573
S4	PDMS (0.189 g)	Hexano (19 ml)	392
S5	PCPMS (0.234 g)	Diclorometano (28 ml)	340
S6	CW (0.286 g)	Ethanol (21 ml)	508

El Array 4 ha sido caracterizado mediante las medidas de las concentraciones de los diferentes simulantes de CWA mostrados en la Tabla 5.13.

Tabla 5.13. Concentraciones medidas por el Array 4 para cada uno de los compuestos.

Simulantes	Concentracion (ppm)
DMMP	0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1
DPGME	0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5
DMA	25, 50, 100, 150, 200, 250
DCE	75, 100, 125, 150, 200, 250
DCM	125, 150, 175, 200, 225, 250,
DCP	5, 10, 15, 20, 25

La respuesta en tiempo real del dispositivo con PECH (S2) como capa sensible debida a la interacción con las diferentes concentraciones de DMMP, se muestra en las Figura 5.28 [12].

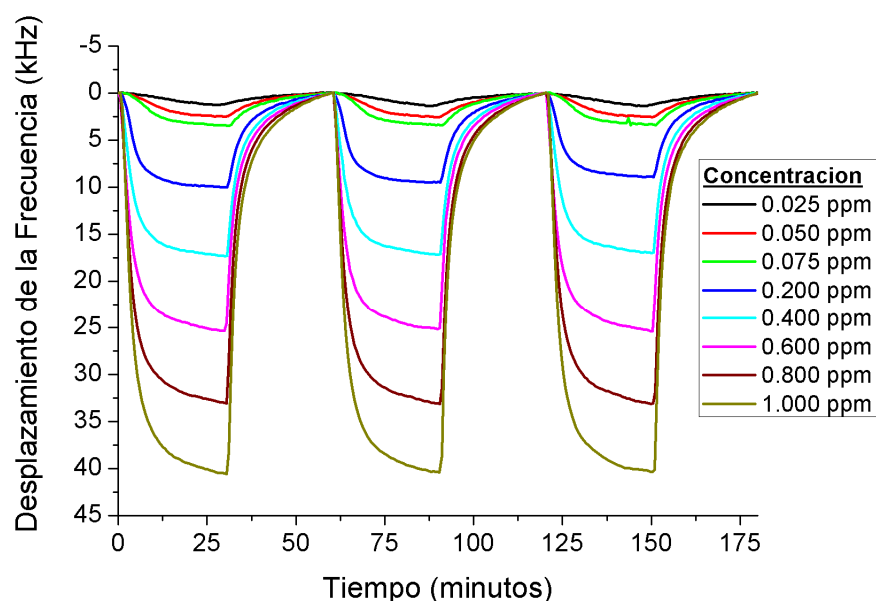


Figura 5.28. Respuesta en tiempo real del sensor (S2) del array 4 para diferentes concentraciones de DMMP.

Para cada uno de los sensores existe una relación lineal entre el desplazamiento de la frecuencia y la concentración (Fig. 5.29). Además en el caso del sensor que utiliza carbowax como capa sensible, se observa muy alta respuesta cuando se deposita por “spinning”. La explicación más plausible es que cuando se deposita por espray este polímero, se generan microgotas en la superficie y esto le hace tener una menor respuesta, además de provocar una gran atenuación en la onda, de tal forma que no se puede depositar una capa de 100 nm de espesor. Mientras que al depositarlo por “spinning” se obtiene una capa homogénea que puede llegar a un espesor aproximado de 100 nm, sin que se amortigüe excesivamente la onda.

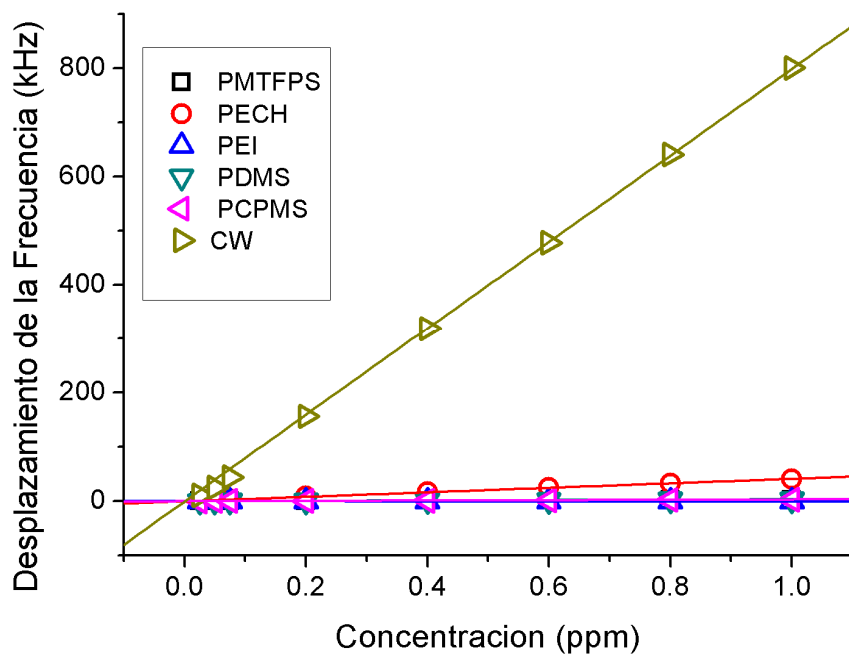


Figura 5.29. Relación lineal entre el desplazamiento de frecuencia y las concentraciones medidas para el DMMP por el Array 4.

Cada simulante de CWA tiene una huella diferente en relación con las respuestas mostradas por el conjunto de sensores (Fig. 5.30).

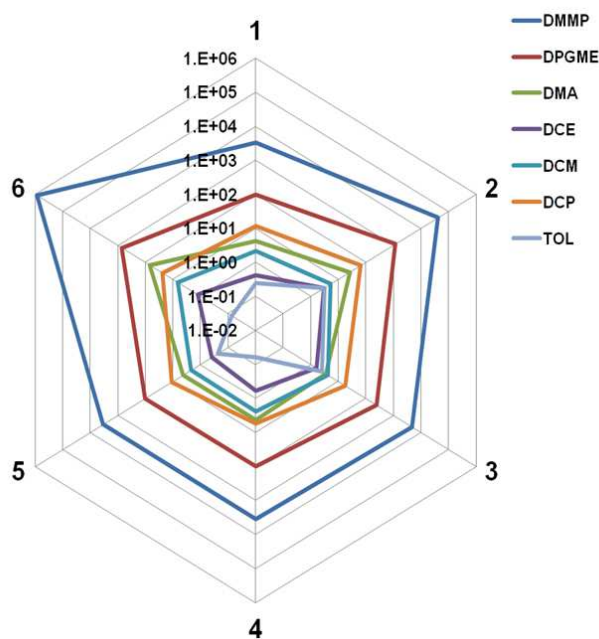


Figura 5.30. Huella característica de cada uno de las simulantes de CWA para cada uno de los sensores del Array 4.

Una vez medidas todas las concentraciones se ha aplicado un análisis de componentes principales y se ha obtenido una buena discriminación entre los diferentes compuestos (Fig. 5.31).

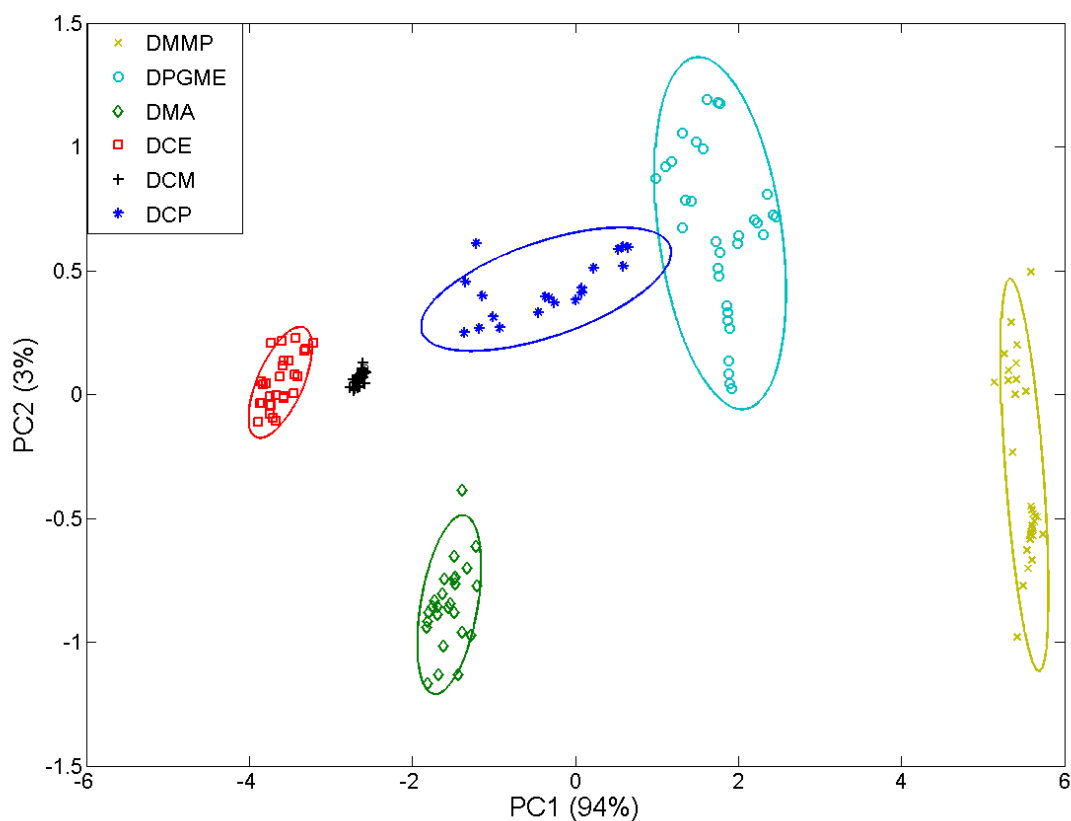


Figura 5.31. Representación de las componentes principales PC1 y PC2 para el Array 4.

Al igual que en los arrays anteriores se ha entrenado una PNN con el PC1, PC2 y PC3 y se ha sometido al proceso de validación cada una de las medidas y se ha obtenido una correcta clasificación de cada una de ellas (100% de aciertos).

5.5. Comparación de la respuesta de los sensores SAW mediante la exposición a un simulante de CWA

Los tres dispositivos desarrollados: un RSAW, un Love de Cuarzo/SiO₂ y un Love de Cuarzo/Novolac se han recubierto con una capa de PECH como capa sensible mediante la técnica de “spinning”, y después se han caracterizado con una concentración de 0.05 ppm de DMMP. El desplazamiento en frecuencia relativo entre ellos se corresponde con bastante aproximación a la sensibilidad calculada en el apartado 5.3.2, como se ve en la

Figura 5.32. Concluyendo que los sensores Love son más sensibles que los RSAW como se preveía y se había dicho anteriormente.

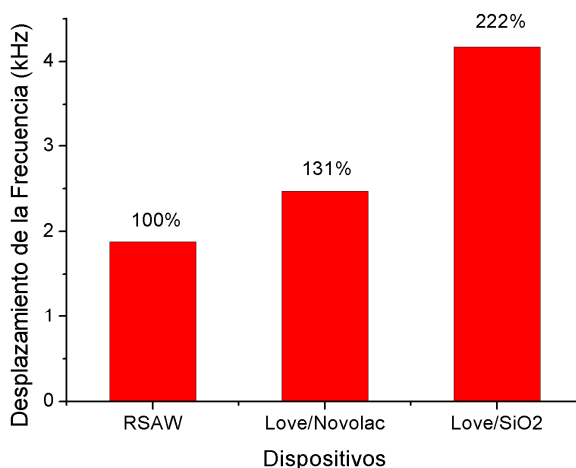


Figura 5.32. Desplazamiento de la frecuencia de resonancia para cada uno de los dispositivos sometidos a una concentración de 0.05 ppm de DMMP.

5.6. Conclusiones

Se han realizado diferentes arrays de sensores, variando el tipo de dispositivo SAW en el que están basados, los polímeros utilizados como capas sensibles y el método para depositarlos. Cada uno de estos arrays se ha testado con los diferentes simulantes de agentes de guerra química seleccionados.

Inicialmente se ha preparado un array de sensores RSAW, depositando como capas sensibles los polímeros propuestos en bibliografía, detectando, discriminando, y clasificando correctamente el 95% de las medidas de los simulantes de CWA.

Se ha demostrado que la ecuación LSER es una herramienta válida para seleccionar los materiales poliméricos óptimos usados como capas sensibles para detectar determinados compuestos volátiles. Por este procedimiento se han seleccionado seis polímeros para detectar, discriminar y clasificar los simulantes, obteniéndose una clasificación del 98% de aciertos para el array de sensores RSAW y un 100% para los arrays de los sensores Love tanto basados en una capa guía de Novolac como en una de SiO₂.

Los diferentes sensores han mostrado una alta sensibilidad, y también una correlación lineal entre el desplazamiento de la frecuencia de resonancia y las diferentes concentraciones de simulantes detectadas, lo cual es muy importante para la calibración de estos arrays.

Se han utilizado para el depósito de la capa sensible las técnicas de espray y “spinning”. Esta última es muy reproducible y ha permitido comparar la sensibilidad de los diferentes dispositivos. Siendo para el dispositivo RSAW $19.1 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$, para el dispositivo Love Cuarzo/ SiO_2 $36.8 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$, y en el caso del Cuarzo/Novolac $22.3 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$.

Cada array se ha probado con diferentes simulantes de agentes de guerra química mostrando su utilidad para detectar bajas concentraciones (mucho menores al LCt_{50} de los agentes reales), discriminar y clasificar cada uno de ellos.

5.7. Referencias

- [1] E. Brunol, F. Berger, M. Fromm, R. Planade, Detection of dimethyl methylphosphonate (DMMP) by tin dioxide-based gas sensor: Response curve and understanding of the reactional mechanism, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 120, Issue 1, 14 December 2006, pp. 35-41.
- [2] Ghenadii Korotcenkov, *Chemical Sensors Comprehensive Sensor Technologies: Volume 6 Chemical Sensors Applications*, Momentum Press, November 02, 2011.
- [3] Zhihua Ying, Yadong Jiang, Xiaosong Du, Guangzhong Xie, Junsheng Yu, Huiling Tai, Polymer coated sensor array based on quartz crystal microbalance for chemical agent analysis, *European Polymer Journal*, Volume 44, Issue 4, April 2008, pp. 1157-1164
- [4] A. Hierlemann, E. T. Zellers, A. J. Ricco. Use of Linear Solvation Energy Relationships for Modeling Responses from Polymer-Coated Acoustic-Wave Vapor Sensors. *Analytical Chemistry*, Vol. 73, (2001), 3458-3466.
- [5] K. Jasek et al. Liquid crystal coating for SAW sensors. *Eur. Phys. J. Special Topics* 154, (2008) 103–106.

- [6] P. Burg, P. Fydrych, J. Bimer, P.D. Salbut, A. Jankowska. Study of the influence of the soluble organic fraction of an exhaust diesel soot by a linear solvation energy relationship approach. *Carbon* 40, (2002) 73–80.
- [7] C. Demathieu, M. M. Chehimi, J. Lipskier. Inverse gas chromatographic characterization of functionalized polysiloxanes. Relevance to sensors technology. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 62, Issue 1, 25 January (2000) 1-7.
- [8] R. A. McGill et al. The design of functionalized silicone polymers for chemical sensor detection of nitroaromatic compounds *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 65, Issues 1-3, 30 June (2000) 5-.
- [9] G. K. Kannan et al. Adsorption studies of carbowax coated surface acoustic wave (SAW) sensor for 2,4-dinitro toluene (DNT) vapour detection . *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 101, Issue 3, 15 July (2004) 328-334.
- [10] D. Matatagui, J. Martí, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Chemical warfare agents simulants detection with an optimized SAW sensor array, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 154, Issue 2, 20 June 2011, pp. 199-205.
- [11] D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. Aleixandre, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Array of Love-wave sensors based on quartz/Novolac to detect CWA simulants, *Talanta*, Volume 85, Issue 3, 15 September 2011, pp. 1442-1447.
- [12] D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Love-wave sensor array to detect, discriminate and classify chemical warfare agent simulants, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Available online 27 February 2012, In Press.

CAPÍTULO 6

DETECCIÓN DE SIMULANTES DE AGENTES DE GUERRA BIOLÓGICA

6.1. Introducción

Para la detección de agentes de guerra biológica se ha utilizado el sistema de medida de líquidos descrito en el apartado 4.4. Los bioagentes presentados en el apartado 2.2.2, son patógenos peligrosos para los seres humanos y solo pueden ser manipulados en laboratorios con medidas de seguridad especiales, por esta razón se ha caracterizado el sistema de medida mediante inmunorreacciones de elementos no patógenos.

6.2. Puesta a punto del sistema experimental para líquidos

Un experimento para la identificación de un elemento biológico a través de una inmunorreacción se compone de numerosos pasos, los principales son: funcionalización mediante la cual se dota al dispositivo de la capacidad de fijar material biológico, fijación del elemento de reconocimiento y detección del analito. Para asegurar que el montaje experimental funciona correctamente se ha llevado a cabo un primer ensayo, reproduciendo un experimento de medida de propiedades de líquidos cuyo resultado se puede encontrar en la bibliografía [1]. El experimento se basa en medir líquidos con distintas densidades y viscosidades, para lo que se han utilizado diferentes disoluciones de glicerol en agua (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Viscosidad y densidad para las diferentes disoluciones de glicerol en agua a 25°C.

Muestra	Viscosidad x 10 ⁻³ [N·s·m ⁻²]	Densidad (kg·m ⁻³)
Agua desionizada	0.893	997
Glicerol 6.6 %	1.093	1018
Glicerol 8.2 %	1.150	1023
Glicerol 10.2 %	1.228	1030
Glicerol 12.8 %	1.339	1038
Glicerol 16 %	1.497	1048
Glicerol 20 %	1.731	1060

Las medidas de las diferentes concentraciones se han tomado a 25 °C y en tiempo real a lo largo del experimento, que ha consistido en las siguientes etapas: se introduce agua desionizada, a continuación se añade glicerol hasta conseguir una concentración del 20% y después se diluye en varios pasos hasta una concentración final de 6.6% (Fig. 6.1). Después de cada paso se ha esperado a que la frecuencia se estabilice. Se ha obtenido un comportamiento lineal del cambio de frecuencia con respecto a la raíz del producto de la densidad por la viscosidad (Fig. 6.2), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por varios autores [1,2].

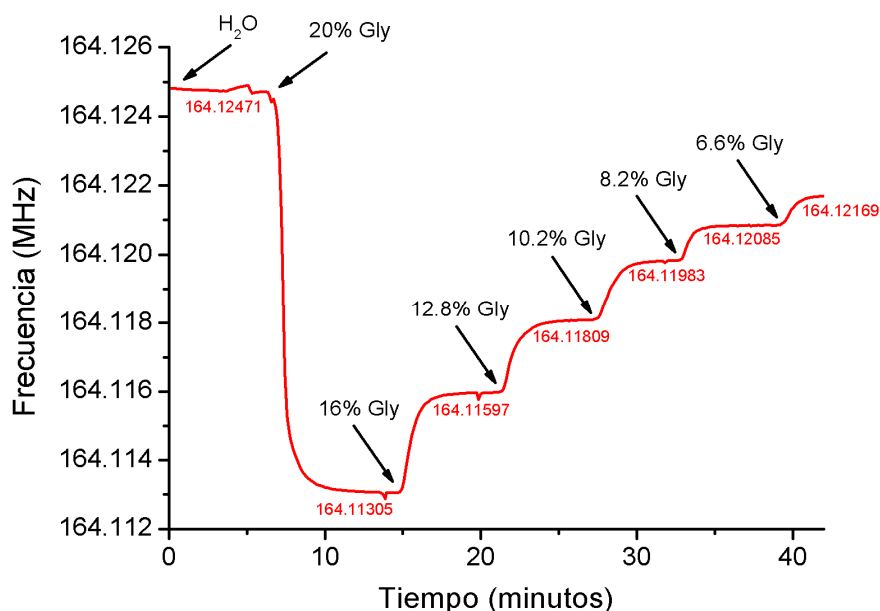


Figura 6.1. Medida en tiempo real de diferentes concentraciones de H₂O y Glicerina.

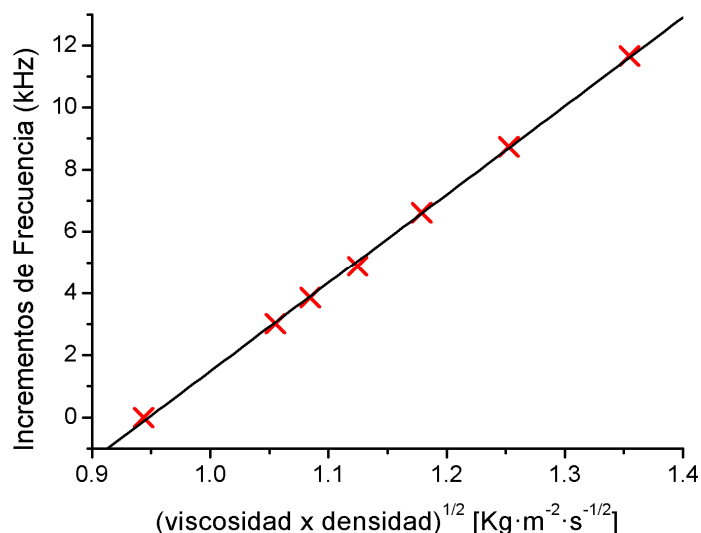


Figura 6.2. Comportamiento lineal de los incrementos de frecuencia con respecto a la $(\text{viscosidad} \times \text{densidad})^{1/2}$.

Por tanto se puede concluir que el sistema de medida en líquidos funciona de forma correcta, y puede ser utilizado para el desarrollo de un inmunosensor.

6.3. Inmunosensor basado en dispositivos de ondas Love

En el ejemplo anterior se ha utilizado el dispositivo Love para medir propiedades de un líquido, pero un inmunosensor requiere la presencia de un elemento de reconocimiento en su superficie, en este caso serán anticuerpos (Fig. 6.3), también denominados como inmunoglobulinas, Ig, introducidos teóricamente en el apartado 2.2.7.2.



Figura 6.3. Imagen de las proteínas que forman un anticuerpo. En rojo y azul se representan las cadenas pesadas, mientras que en verde y amarillo las cadenas ligeras.

El método más común para fijar los anticuerpos se basa en la existencia de los grupos funcionales específicos y reactivos tal como el grupo amino ($-\text{NH}_2$), distribuidos por todo el anticuerpo, los cuales pueden dar lugar a un enlace covalente. Este método se ha utilizado para fijar los anticuerpos al dispositivo mediante una funcionalización de la superficie de SiO_2 , que reacciona con los grupos amino, dando lugar al enlace covalente.

6.3.1. Protocolo de funcionalización de la superficie de la capa guía del dispositivo Love (SiO_2)

El dispositivo Love se ha funcionalizado siguiendo los pasos del siguiente protocolo [3] (Fig. 6.4):

- Primero, la formación de grupos hidroxilo en la superficie de SiO_2 se realiza usando una disolución piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$, 3:1, v/v), que se deposita mediante una micropipeta en la zona de interés, permaneciendo en reposo durante 5 minutos. De este modo, tras dos procesos de aclarado con agua desionizada, cada uno de 5 min, se obtiene una superficie hidrófila.
- Después de un cuidadoso secado con nitrógeno, se procede a la silanización del dispositivo, sumergiéndolo en 10 ml de una disolución 20 mM de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) en tolueno durante una hora (15 min en ultrasonidos, 15 min en reposo, 15 min en ultrasonidos y 15 min en reposo), seguido de dos limpiezas en tolueno y una en isopropanol, todas ellas realizadas en ultrasonidos durante periodos de 15 min. De esta forma los grupos silanos del APTES reaccionan con los grupos hidroxilo generados en el paso anterior, quedando anclados y recubriendo la superficie de SiO_2 .
- Seguidamente se introduce el dispositivo en 10 ml de una disolución 20 mM de glutaraldehído (GA) durante 1 hora en reposo, seguido por dos aclarados con agua desionizada durante 15 min en reposo.

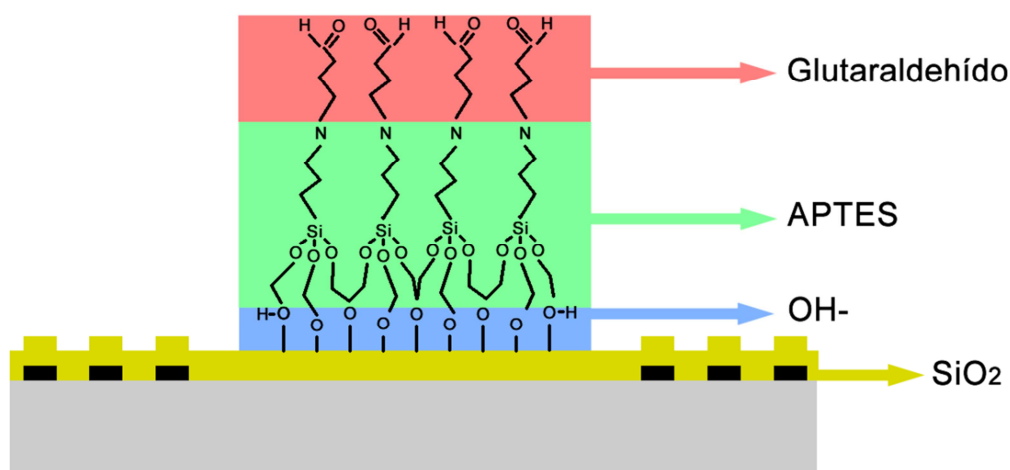


Figura 6.4. Diferentes etapas de la funcionalización de la superficie de SiO_2 .

6.3.2. Elemento de reconocimiento - Anticuerpo

El GA se usa como puente de unión entre los grupos amino del APTES y las aminas primarias de los anticuerpos, obteniendo una monocapa de anticuerpos preparados para reconocer su antígeno. El hecho de que cada anticuerpo tenga varias aminas primarias a lo largo de su estructura, da lugar a que la orientación de éstos sea aleatoria en la superficie (Fig. 6.5), y por tanto habrá anticuerpos que no participen en la inmunorreacción debido al mal posicionamiento de sus parátomos.

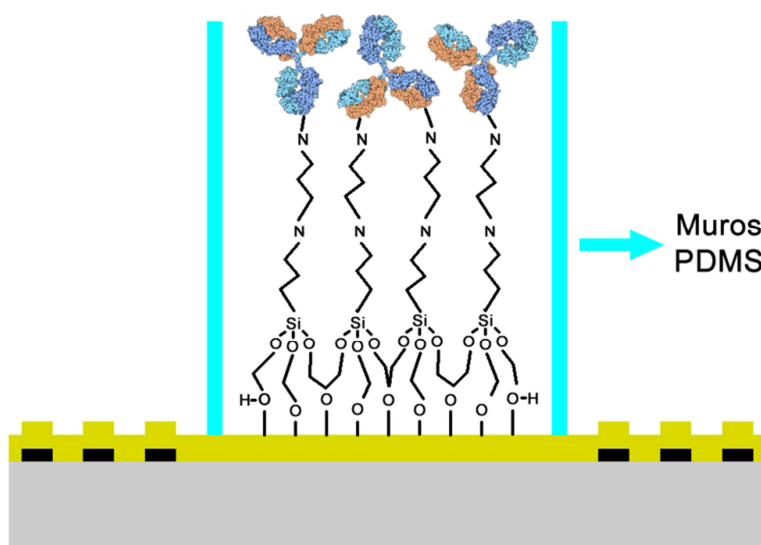


Figura 6.5. Fijación de los anticuerpos a la superficie de SiO_2 funcionalizada.

6.3.3. Detección de inmunoglobulina de conejo

Esta parte de la investigación se ha llevado a cabo con la colaboración del grupo de *Microsistemas, Actuadores y Sensores* de la *Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Ciudad Real*, que han aportado tanto el protocolo de funcionalización del dispositivo, como el protocolo de la inmunoreacción que se explica en este apartado. Finalmente, el trabajo en común ha permitido comparar los resultados del sistema de medida presentado en este trabajo con los resultados obtenidos anteriormente por dicho Grupo con un sistema basado en una microbalanza de cuarzo [3].

La primera inmunodetección que se ha realizado con el dispositivo Love ha consistido en la detección en modo dinámico de un monómero de inmunoglobulina G de conejo (Rabbit-IgG – I8140 Sigma) como antígeno, mediante la identificación con un anticuerpo policlonal de cabra afín a la inmunoglobulina de conejo (polyclonal goat antirabbit-IgG, GAR – R2004 Sigma).

6.3.3.1. Protocolo de medida

La temperatura del dispositivo se ha fijado en 30 °C, debido a que es una temperatura próxima a la del cuerpo de los vertebrados en los que se producen las inmunorreacciones. Para poder controlar el volumen de la muestra que tenemos en los conos de entrada al microcanal, se han utilizado puntas de micropipetas graduadas de 200 µl. A lo largo del experimento se ha programado la bomba de jeringas para establecer un flujo continuo de 3 µl/min. Esto quiere decir que el líquido circula por la zona de interés (entre los IDTs) a una velocidad de 0.1 mm·s⁻¹. El protocolo de medida consta de los siguientes pasos (Fig 6.6 y 6.7):

- Después de la funcionalización del dispositivo (apartado 6.3.1) se ha procedido inmediatamente, a la incorporación del sensor en la celda de medida, para evitar así una degradación de la funcionalización con el tiempo. El primer paso en el protocolo de medida es llenar los conos con 200 µl de una solución tampón (Tris Buffered Saline, TBS), establecer el flujo y dejar que se estabilice la frecuencia.
- Una vez que la frecuencia se ha estabilizado, se espera a que en el cono queden 100 µl de TBS, y en este momento se introducen 100 µl de anticuerpos GAR

con una concentración de $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Después se mezcla la disolución de anticuerpos con el TBS del cono para obtener una concentración final de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se deja pasar durante el tiempo necesario para que la frecuencia se estabilice, lo que significa que prácticamente toda la superficie está funcionalizada con una monocapa de anticuerpos; este proceso requiere un tiempo aproximado de 40 min.

- Cuando tenemos los anticuerpos fijados a la superficie que había sido funcionalizada con anterioridad, se hace un proceso de enjuague con TBS, para eliminar tanto los anticuerpos que permanecen en el cono, como los que tengan una unión débil con la superficie, hasta que la frecuencia se estabiliza.
- En este momento se tiene una superficie recubierta con una monocapa de anticuerpos unida de forma covalente a la superficie de SiO_2 , pero puede quedar parte de la superficie aún activada y por tanto puede reaccionar fijando el elemento que se desea detectar o cualquier otro material biológico. Por esta razón, se utiliza un bloqueador (albúmina de suero bovino, BSA). De este modo con 50 μl de TBS en el cono, se introducen otros 50 μl de una disolución de $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de BSA y se mezclan, para obtener una muestra homogénea de 100 μl con una concentración $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, la cual se deja pasar por el microcanal aproximadamente 30 min hasta que se estabiliza la frecuencia.
- Al igual que después de la fijación de los anticuerpos, se hace un enjuague con TBS.
- Con el inmunosensor preparado para reconocer el analito o antígeno de interés, se mezclan 50 μl de la disolución del Rabbit-IgG, con una concentración al doble de la queremos detectar, con los otros 50 μl que permanecen en el cono.
- En algunas de las medidas, después de la detección se ha realizado un enjuague para verificar que la inmunorreacción se ha producido correctamente permaneciendo el antígeno atrapado por el anticuerpo y por tanto sin una recuperación de la frecuencia.

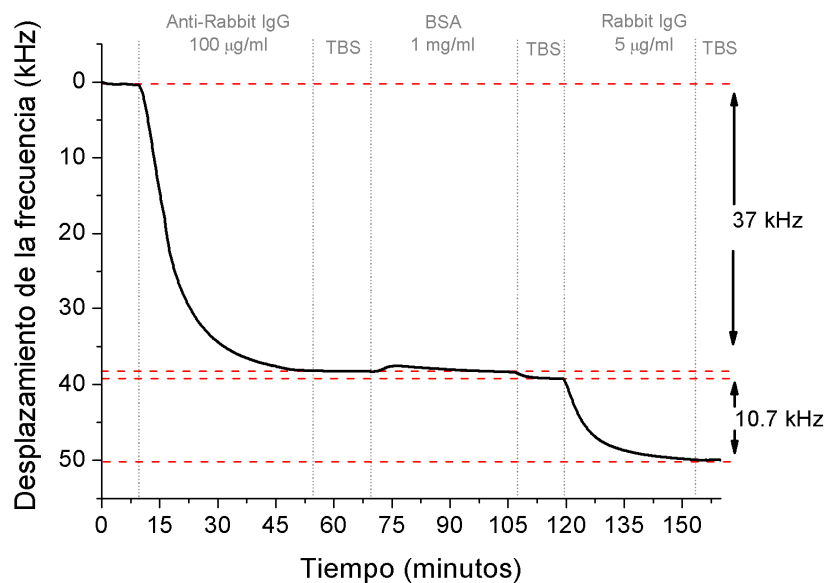


Figura 6.6. Desplazamiento de la frecuencia de resonancia para los siguientes pasos: i) $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ del anticuerpo GAR, ii) BSA y iii) $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de inmunoglobulina de conejo, con un enjuague realizado entre pasos.

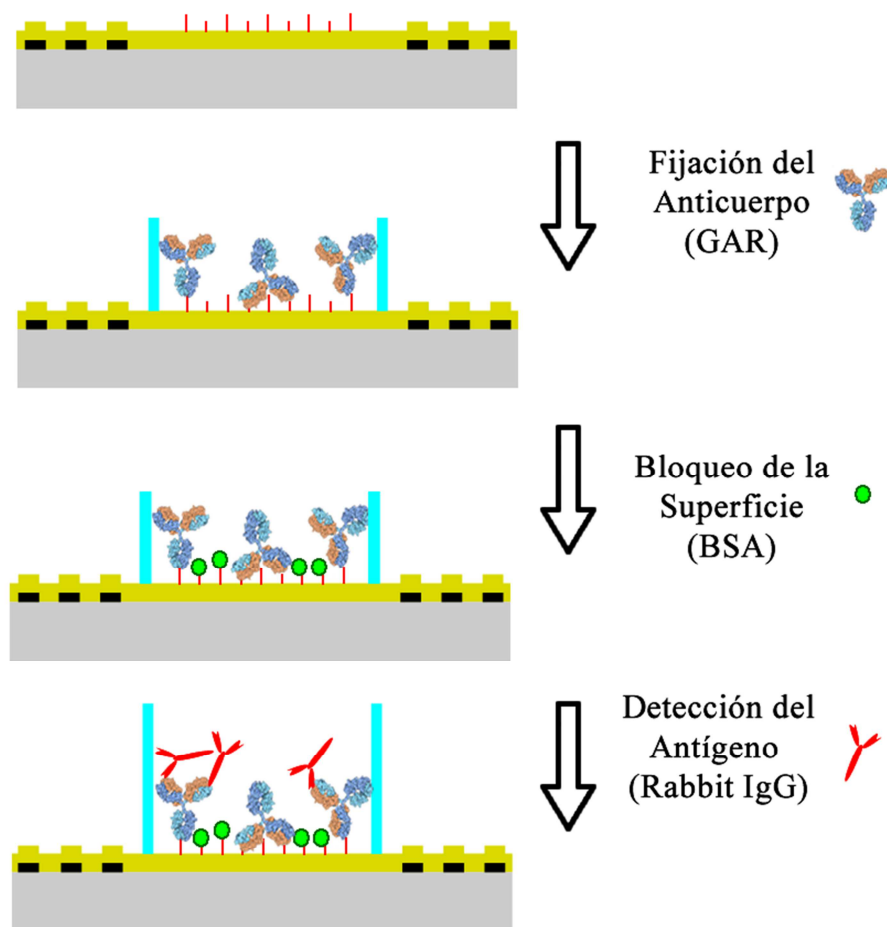


Figura 6.7. Esquema de las diferentes etapas en la detección de antígeno (Rabbit-IgG).

6.3.3.2. Resultados de la inmunorreacción

El dispositivo Love es un sensor másico, y por tanto hay una concordancia entre el desplazamiento de la frecuencia de resonancia y la cantidad de anticuerpos fijados. Además, en esta inmunorreacción hay una relación entre el número de anticuerpos fijados y antígenos detectados. Por esta razón en el proceso de detección también se mide la fijación de anticuerpos en la superficie del sensor, y similares desplazamientos de frecuencia indican un número parecido de anticuerpos fijados. Se han comparado tres respuestas de la frecuencia de resonancia en el proceso de fijación de los anticuerpos y se ha obtenido un desplazamiento de $37 \text{ kHz} \pm 2.5 \text{ kHz}$ (Fig. 6.8). Este resultado hace posible la comparación entre las respuestas de diferentes concentraciones de antígeno.

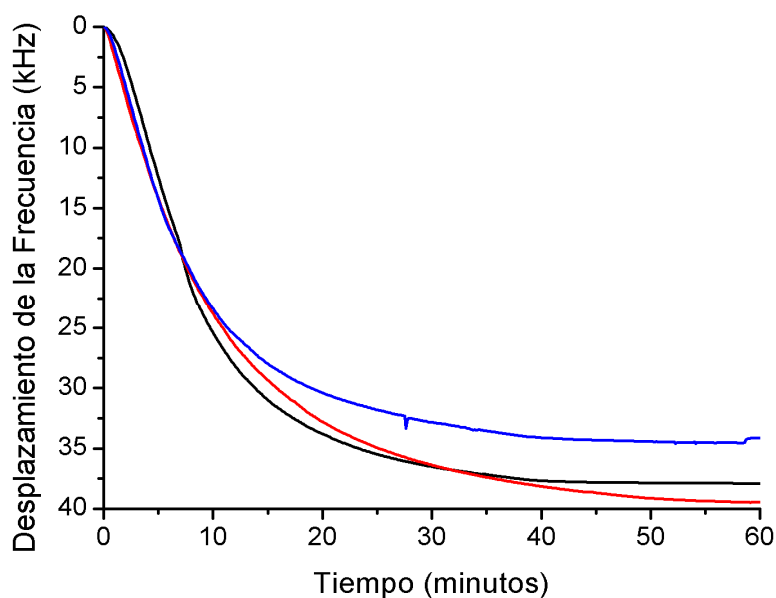


Figura 6.8. Diferentes respuestas en frecuencia debido a la fijación del anticuerpo GAR en la superficie de SiO_2 .

Una vez la superficie del dispositivo (definida por el microcanal) se encuentra recubierta por una monocapa de anticuerpos y se ha bloqueado la funcionalización de la misma, se tiene el inmunosensor preparado para la detección. Se han detectado tres concentraciones diferentes de Rabbit-IgG: $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, y $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, obteniendo diferentes respuestas para cada concentración (Figura 6.9), permitiendo su discriminación.

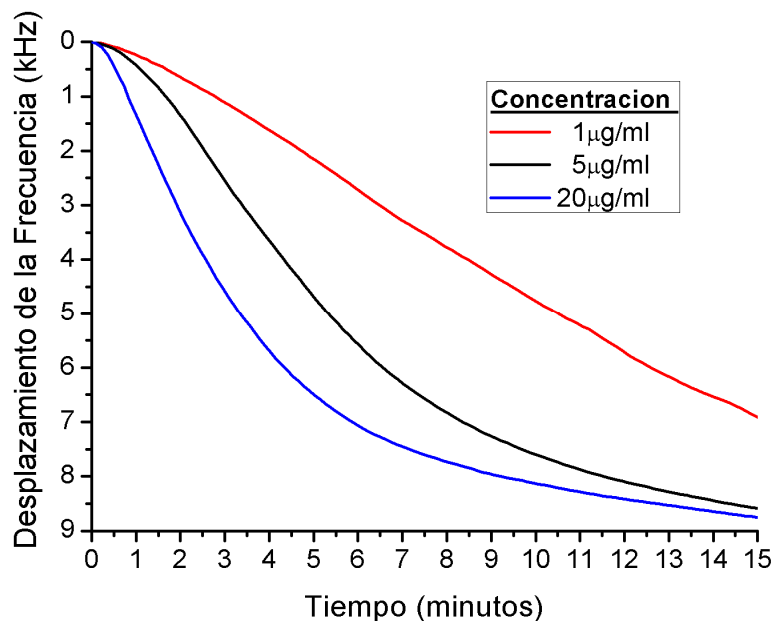


Figura 6.9. Desplazamiento de la frecuencia de resonancia en tiempo real para las diferentes concentraciones del antígeno (inmunoglobulina de conejo).

6.3.3.3. Novedades del sistema presentado comparado con los de una microbalanza de cuarzo (QCM) trabajando en modo estático.

La balanza de cuarzo es un sistema establecido para la detección de inmunorreacciones. Por esta razón se han comparado los anteriores resultados obtenidos para la detección del Rabbit-IgG, detectado con un sensor Love en modo dinámico, con la misma inmunorreacción detectada con un sensor QCM en modo estático [3]. En ambos inmunosensores (QCM y Love) se ha utilizado el mismo método de funcionalización para fijar los anticuerpos a la superficie, por lo que se supone que la densidad superficial de anticuerpos en la saturación es la misma en ambos sensores. Por la referencia [3] se sabe que la densidad superficial de masa es $602 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. El desplazamiento de la frecuencia del sensor QCM (frecuencia del primer modo 5MHz) para dicha densidad superficial de masa es 34 Hz, por tanto según la ecuación 4-1 este sensor tiene una sensibilidad de $S_m^f = 1.1 \text{ m}^2\cdot\text{Kg}^{-1}$. En el apartado anterior se calculó una media del desplazamiento de frecuencia para la fijación de los anticuerpos de 37 kHz para el sensor Love, por tanto para este caso la sensibilidad es $S_m^f = 38 \text{ m}^2\cdot\text{Kg}^{-1}$, valor considerablemente superior a la del sensor QCM, siendo una ventaja de los inmunosensores Love, con respecto a los inmunosensores QCM.

En el apartado 4.4.1. se ha explicado la razón por la cual se ha desarrollado un sistema de detección en modo dinámico en lugar de uno en modo estático. En resumen, se puede decir que se rompe la barrera que nos impone el proceso de difusión para que anticuerpo y antígeno se encuentren e interaccionen, siendo promovida esta interacción en los sistemas dinámicos por el transporte continuo de los antígenos como consecuencia de la circulación de la muestra. Para los sistemas estáticos, como el que se ha utilizado con el sensor QCM, dependiendo de la concentración del antígeno, se tienen diferentes desplazamientos de frecuencia, siendo ésta prácticamente estable aunque aún permanezca antígeno sin reaccionar. Sin embargo para los sistemas dinámicos, como el utilizado por el sensor Love, hay una tendencia asintótica hacia un valor de saturación de antígeno (Figura 6.9). Por esta razón, para diferenciar concentraciones de antígeno con un sistema dinámico como el presentado, es más apropiado estudiar otras magnitudes como es la velocidad de la reacción. La ventaja de los sistemas dinámicos es la mayor respuesta en frecuencia (ya que siempre se tiende a la saturación) y más rápida, debido al transporte de antígeno. En la Figura 6.10 se muestra el desplazamiento de la frecuencia de resonancia para la detección de antígeno por el sensor QCM después de una hora de medida, y la velocidad de variación de la frecuencia de resonancia del sensor Love medida en los tres primeros minutos.

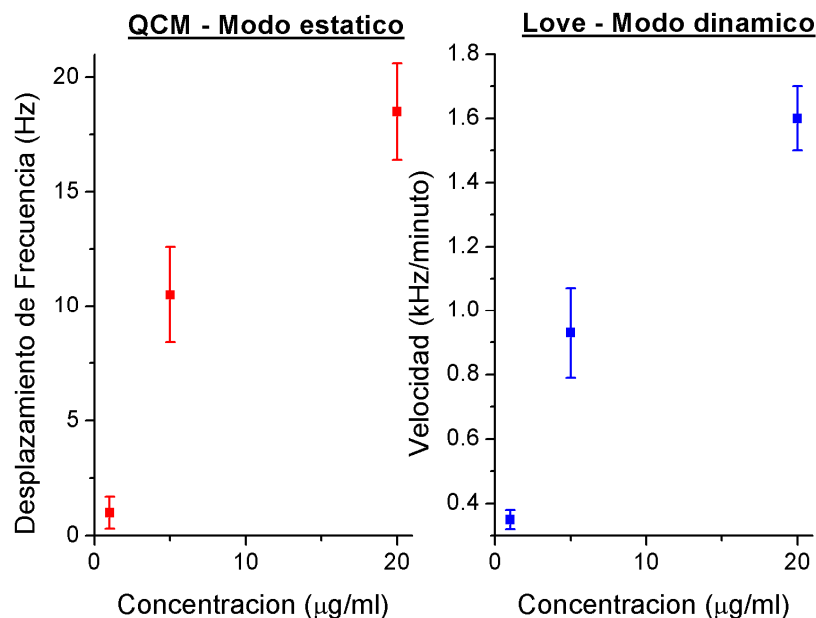


Figura 6.10. Se muestran los resultados para la detección de antígeno después de una hora por un sensor QCM trabajando en modo estático [3], y la velocidad del desplazamiento de la frecuencia del sensor Love para en un tiempo de 3 min, trabajando en modo dinámico.

6.3.3.4. Utilización de un anticuerpo conjugado con nanopartículas de oro para la inmunodetección

Para concentraciones muy bajas de antígeno, puede darse el caso de que el cambio de masa ocasionado por la inmunorreacción en la superficie del sensor sea insignificante, y por tanto el sensor Love no lo detecte, ya que mide cambios de masa. Esto es una desventaja para la detección de bioagentes, ya que tanto la infección como las consecuencias de ésta, dependen del número de réplicas y no de la masa. La masa de los bioagentes suele ser muy pequeña, siendo una dificultad añadida para medir bajas concentraciones.

Por esto se propone un método alternativo para medir muy bajas concentraciones de antígeno, que consiste en utilizar un anticuerpo secundario afín para formar una estructura tipo sándwich (anticuerpo - antígeno - anticuerpo). Es decir, una vez se ha producido la inmunorreacción principal entre anticuerpo y antígeno, se hace pasar una concentración elevada de un anticuerpo afín con el antígeno. De este modo el antígeno se detecta de forma indirecta a través del cambio de frecuencia de resonancia debido al anticuerpo secundario que puede unirse a un epítopo libre. Las ventajas de este método son las siguientes:

- En primer lugar que la concentración del anticuerpo secundario se puede elegir, y por tanto con una alta concentración, la saturación de anticuerpos enlazados con los antígenos será muy rápida (pocos minutos).
- Por otro lado hay métodos para funcionalizar diversas nanopartículas con anticuerpos: sílice [4], ferromagnéticas [5], oro [6], y por tanto es posible aprovechar los anticuerpos conjugados con nanopartículas para obtener cambios significativos en la frecuencia de resonancia, debidos a la masa que aportan las nanopartículas. Esto ha sido probado con nanopartículas de oro de ~10 nm funcionalizadas con el anticuerpo GAR, comercialmente disponible (Sigma G7402), demostrando un cambio de frecuencia importante debido a los anticuerpos conjugados con las nanopartículas. Es interesante que las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos tengan un tamaño lo mas grande posible para que prevalezca su masa, aunque esto podrá producir una saturación espacial (Fig. 6.11 y 6.12).

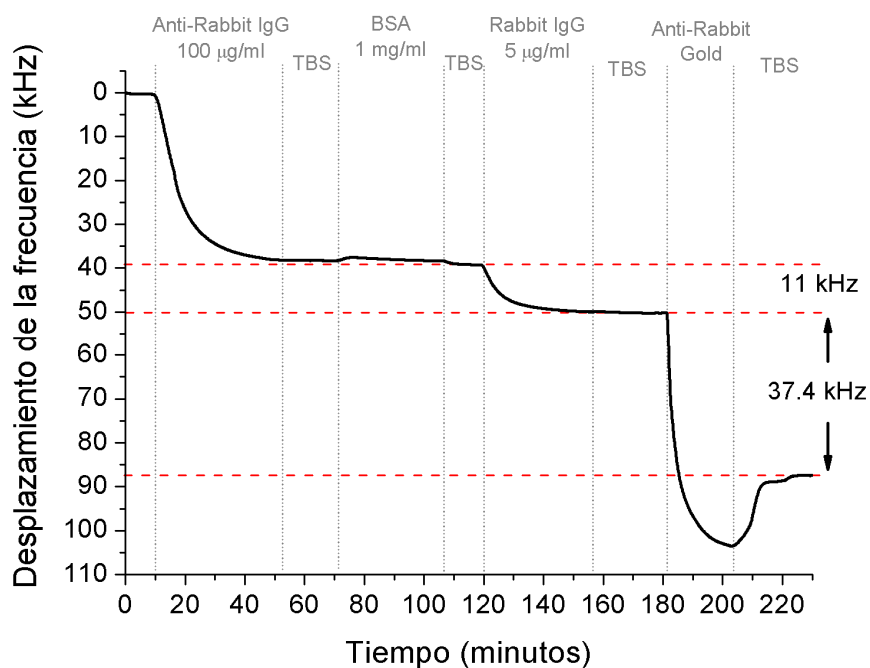


Figura 6.11. Respuesta de la frecuencia de resonancia para los siguientes pasos: i) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del anticuerpo GAR, ii) BSA, iii) $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de inmunoglobulina de conejo y iv) anticuerpos GAR conjugados con nanopartículas de oro.

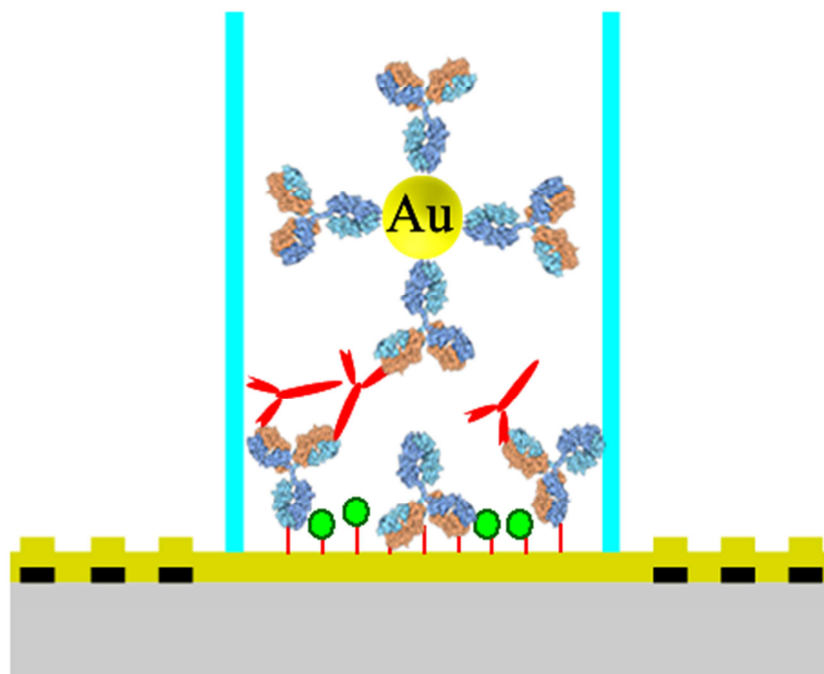


Figura 6.12. Esquema de las diferentes etapas en la detección de antígeno (Rabbit-IgG), mediante un anticuerpo secundario conjugado con nanopartículas de oro.

Para comprobar la eficiencia de la inmunorreacción entre anticuerpos conjugados con las nanopartículas de oro, se han depositado diferentes densidades superficiales de Rabbit-IgG (este sigue siendo el antígeno) sobre la superficie de SiO₂ funcionalizada según el protocolo explicado en el apartado 6.3.1. Después se ha hecho pasar los anticuerpos conjugados con las nanopartículas de oro, provocando un desplazamiento de frecuencia mayor que el de la inmunoglobulina de conejo (Rabbit-IgG). Una densidad superficial de masa depositada equivalente a 31 kHz se ha conseguido pasando una concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Rabbit-IgG (Fig. 6.13), y otra densidad de masa equivalente a 7.9 kHz se ha conseguido pasando una concentración de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Rabbit-IgG (Fig. 6.14). Además, se observa que el cambio de frecuencia debido a los anticuerpos conjugados es de 41.5 kHz para el primer caso y 23.8 kHz para el segundo. El desplazamiento de frecuencia no es proporcional al número de antígenos depositados, y esto se debe a la saturación espacial, ya que los anticuerpos conjugados con oro son más grandes que el antígeno, pudiendo quedar antígenos sin reaccionar debido a la falta de espacio.

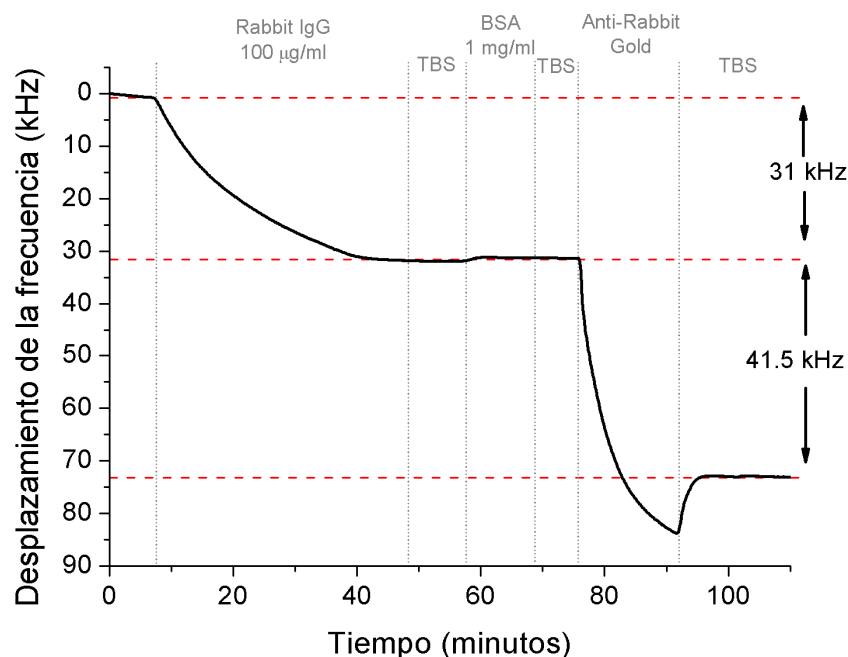


Figura 6.13. Respuesta de la frecuencia para los siguientes pasos: i) 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de inmunoglobulina de conejo ii) BSA, y iii) nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos GAR.

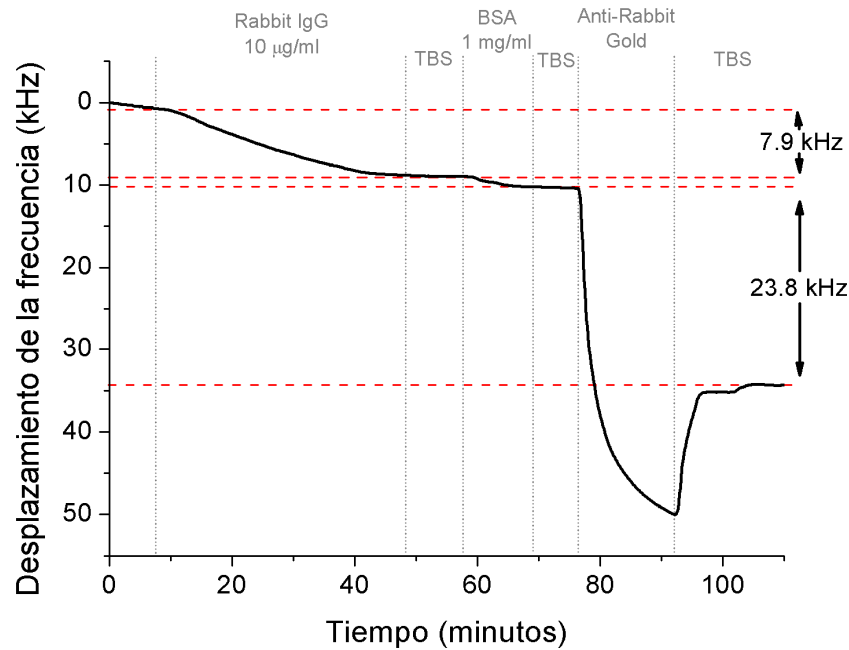


Figura 6.14. Respuesta de la frecuencia para los siguientes pasos: i) $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de inmunoglobulina de conejo ii) BSA, y iii) nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos GAR.

Mediante la técnica de análisis SEM es la posible observar metales a través del material biológico, y por tanto una inmunorreacción en la que han intervenido nanopartículas de oro va a permitir observar mediante esta técnica cada enlace antígeno-anticuerpo. Se puede ver que para el caso correspondiente a la Figura 6.13, es decir para un desplazamiento de la frecuencia de resonancia debido a los anticuerpos conjugados con nanopartículas de 41.5 kHz, la densidad de partículas de oro (Fig. 6.15) es mayor que para el correspondiente a la Figura 6.14 con un desplazamiento de 23.8 kHz (Fig. 6.16).

Además, en toda el área donde son detectadas las inmunorreacciones se han realizado diversos barridos, mostrando una uniformidad de las nanopartículas de oro y por tanto de las inmunorreacciones. Esto es coherente con los resultados de la simulación que predecían una velocidad muy parecida en toda la zona de interés del microcanal (Fig. 4.49).

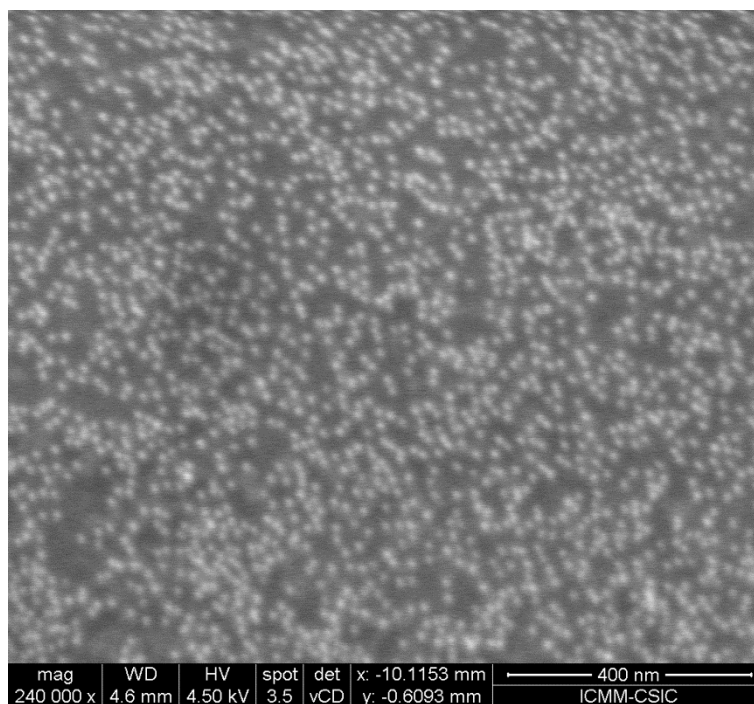


Figura 6.15. Imagen realizada mediante SEM para las nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos GAR, que se han unido al antígeno, correspondiente a la figura 6.13.

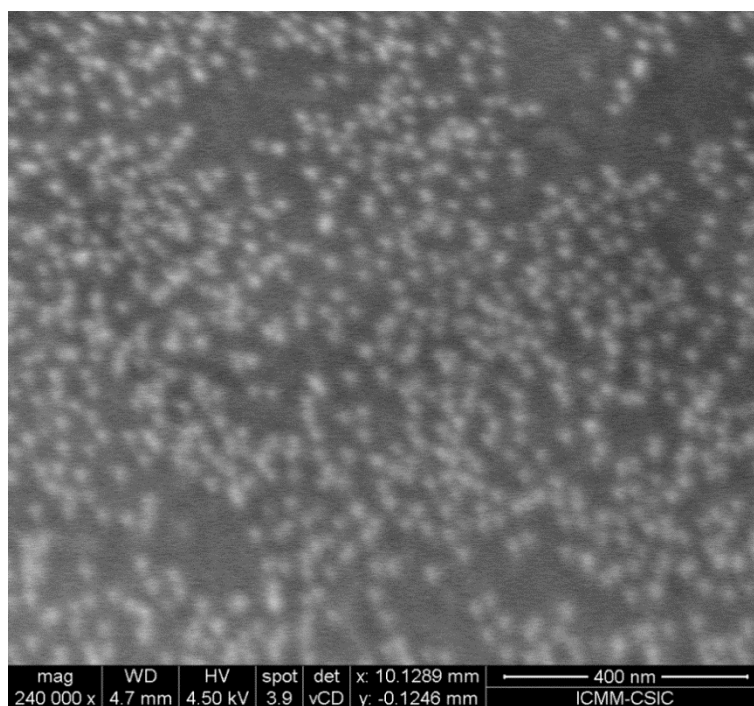


Figura 6.16. Imagen realizada mediante SEM para las nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos GAR, que se han unido al antígeno, correspondiente a la figura 6.14.

6.3.4. Detección del virus M13

Para probar el sistema con un virus y debido a la complejidad de la inmunología, se ha colaborado con La *Universidad de Burdeos*, tanto con el Dr. Daniel Moynet del *Laboratorio de Inmunología* como con el grupo de *Integración de Materiales en Sistemas* (CNRS-Burdeos).

El virus M13 (Fig. 6.17) es un bacteriófago [7,8], es decir que únicamente infecta bacterias, también son denominados de forma abreviada como “fagos”. Es filamentoso, con dimensiones de 900 nm de largo, 9 nm de diámetro y un peso de 3.1×10^{-18} Kg. El fago se compone de un ADN de cadena simple formado por 6407 nucleótidos, encapsulado por una capa que consta aproximadamente de 2800 copias de la proteína P8 y cinco copias de las proteínas P3, P6, P7 y P9. La proteína P3 ataca a la punta del pilus sexual del huésped *Escherichia coli*, infectando la bacteria al inyectar su material genético dentro del citoplasma. La información genética del fago pasa entonces a controlar la maquinaria de la célula bacteriana desviando la síntesis de la bacteria hacia la fabricación de nuevas réplicas del fago.

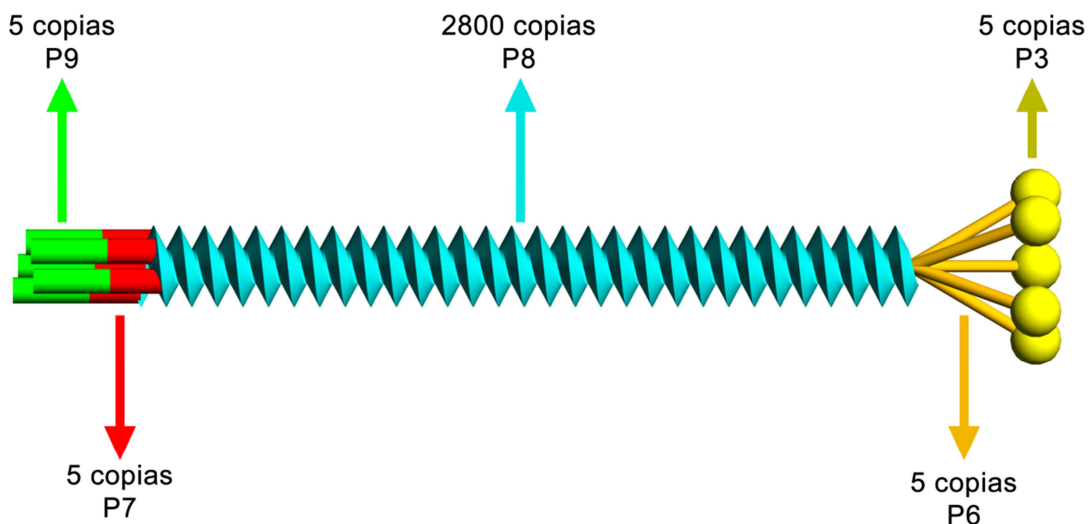


Figura 6.17. Esquema del virus M13.

El anti-M13 (AM13) es un anticuerpo monoclonal de ratón que se usa para identificar el fago M13, debido a que tiene gran afinidad con la proteína P8. Además para verificar

esta alta afinidad y la veracidad de la detección a través del anticuerpo AM13, se ha utilizado un anticuerpo diferente (goat anti-mouse, GAM) que se ha usado como control. Hacer un control de la medida es la razón por la cual el dispositivo Love para líquidos se compone de dos líneas de retardo, permitiendo detectar el bioagente en una línea de retardo con un anticuerpo que tenga alta afinidad y a la vez hacer un control en la otra línea mediante un anticuerpo con baja afinidad, verificando así la presencia del bioagente cuando en la línea de retardo principal se produce un considerable desplazamiento de la frecuencia de resonancia con respecto a la línea de retardo utilizada como control.

6.3.4.1. Contabilización de fagos por la técnica de doble placa de agar (DLA)

El proceso de infección de una bacteria termina con la liberación de muchos fagos cuando la pared de la célula bacteriana se rompe, denominándose lisis a este proceso de ruptura, tras la cual los fagos descendientes infectan a las bacterias vecinas. Este fenómeno produce un incremento exponencial en el número de células lisadas.

Este proceso es el que se utiliza en la técnica de doble placa de agar (doble-layer agar, DLA), para contabilizar los fagos. La técnica consiste en incubar el fago con la bacteria *E. coli* (en este caso X11Blue) crecida a 37 °C y luego se deposita en una capa de agar blando sobre un disco Petri con 30 ml de agar duro. Después de toda una noche de incubación, cada fago ha formado una placa (infección de las bacterias en una determinada área) que puede observarse a simple vista en el césped de bacterias opaco (Fig. 6. 18). Esto permite contar en placas formadas por unidad (pfu) determinando el número de pfu·ml⁻¹, que corresponde al número de fagos·ml⁻¹.

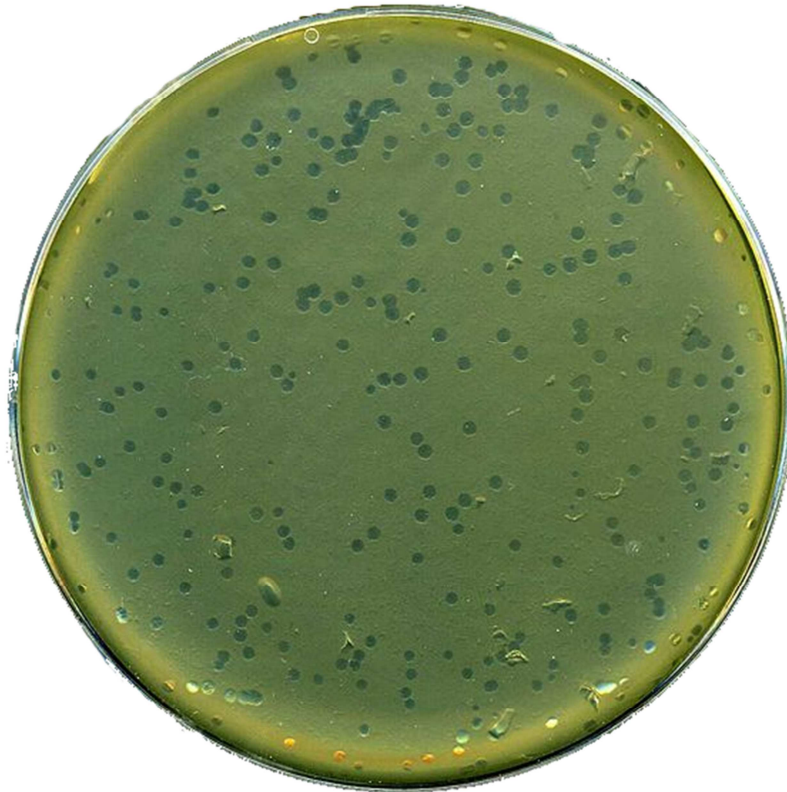


Figura 6.18. Placas de fagos M13 en la bacteria E. coli.

6.3.4.2. Protocolo de detección del fago

Al igual que en la detección de la inmunoglobulina de conejo, se establece una temperatura de 30 °C para el dispositivo. Inicialmente se realiza una funcionalización de la superficie del dispositivo según el protocolo expuesto en el apartado 6.3.1, inmediatamente después, los pasos seguidos a lo largo del proceso de medida son los siguientes (Fig. 6.19 y 6.20):

- En primer lugar se llenan los conos con 200 μl de TBS, se establece un flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (correspondiente a una velocidad de $0.33 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ entre los IDTs) y se deja que la frecuencia se estabilice.
- Una vez que la frecuencia está estable se espera a que en el cono queden 100 μl de TBS, y en este momento se introducen 100 μl de una concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de anticuerpos AM13, o GAM si se trata del control. Se mezcla la disolución de anticuerpos con el TBS del cono para obtener una concentración

- final de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se deja pasar el tiempo necesario para que la frecuencia llegue a estabilizarse estable.
- Cuando se tienen los anticuerpos fijados a la superficie que había sido funcionalizada, se hace un proceso de enjuague con TBS para eliminar tanto los anticuerpos que permanecen en el cono, como los que tienen una unión débil con la superficie, hasta que la frecuencia se vuelve a estabilizar.
 - La superficie funcionalizada se bloquea con BSA.
 - Después se hace un enjuague con TBS, y cuando se estabiliza la frecuencia se cambia el flujo de $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a un flujo de $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ (correspondiente a una velocidad de $0.7 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ entre los IDTs) y se deja que se vuelva a estabilizar la frecuencia.
 - En este punto el inmunosensor está preparado para reconocer el fago de interés, y por tanto se mezclan $100 \mu\text{l}$ de la disolución del fago, de doble concentración a la que se desea detectar, con los otros $100 \mu\text{l}$ que se tienen en el cono.
 - En algunas de las medidas, después de la detección se ha realizado un enjuague para verificar la detección mediante la inmunorreacción, quedando el antígeno atrapado por el anticuerpo y por tanto sin una recuperación de la frecuencia.

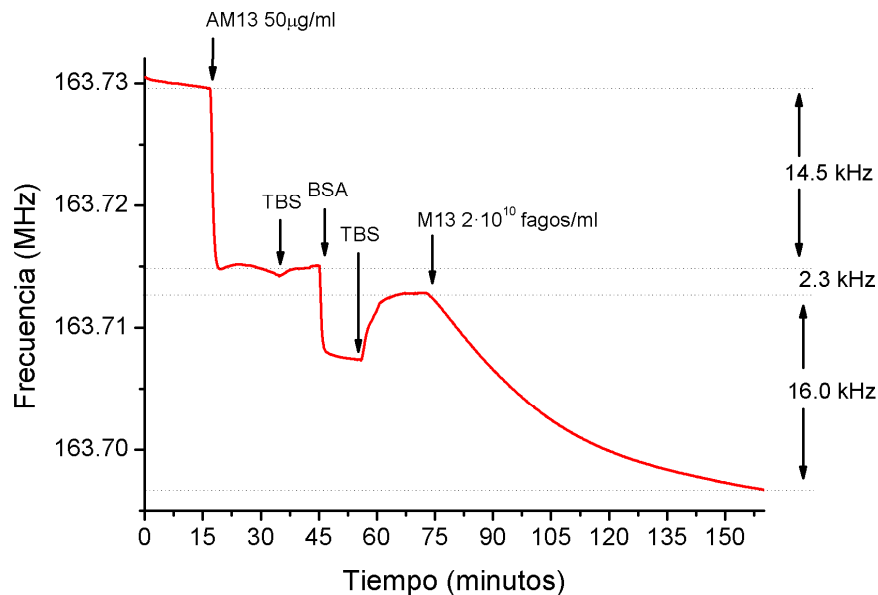


Figura 6.19. Respuesta de la frecuencia para los siguientes pasos: i) $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ del anticuerpo AM13, ii) BSA y iii) $2 \cdot 10^{10} \text{ pfu}\cdot\text{ml}^{-1}$, con un enjuague realizado entre pasos.

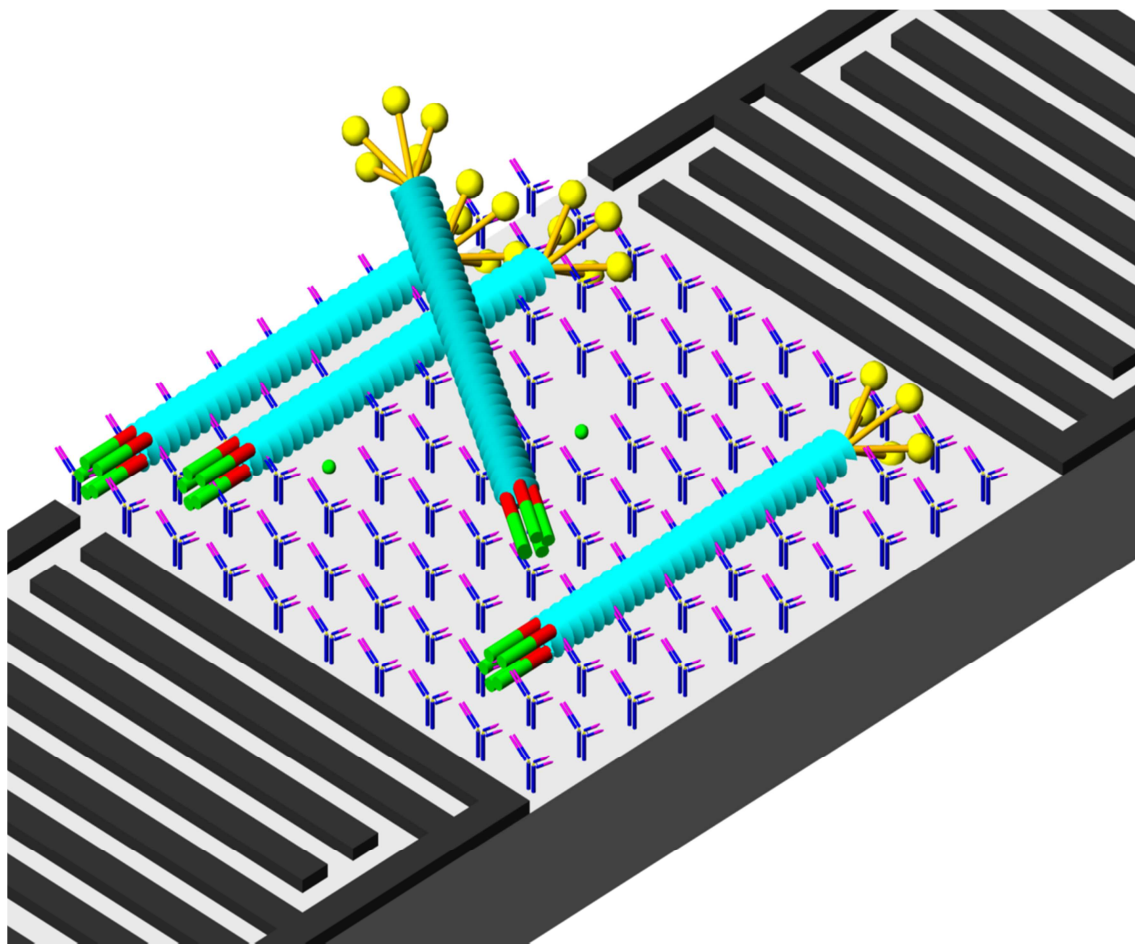


Figura 6.20. Esquema de la inmovilización del M13 en la superficie del sensor.

6.3.4.3. Resultados de la inmunoreacción

Diferentes concentraciones de fagos se han detectado en tiempo real mediante el anticuerpo AM13 (Fig.6.21), ilustrando la tendencia hacia la saturación al igual que en el caso de la inmunoglobulina de conejo, ya que se trata de un sistema dinámico de detección.

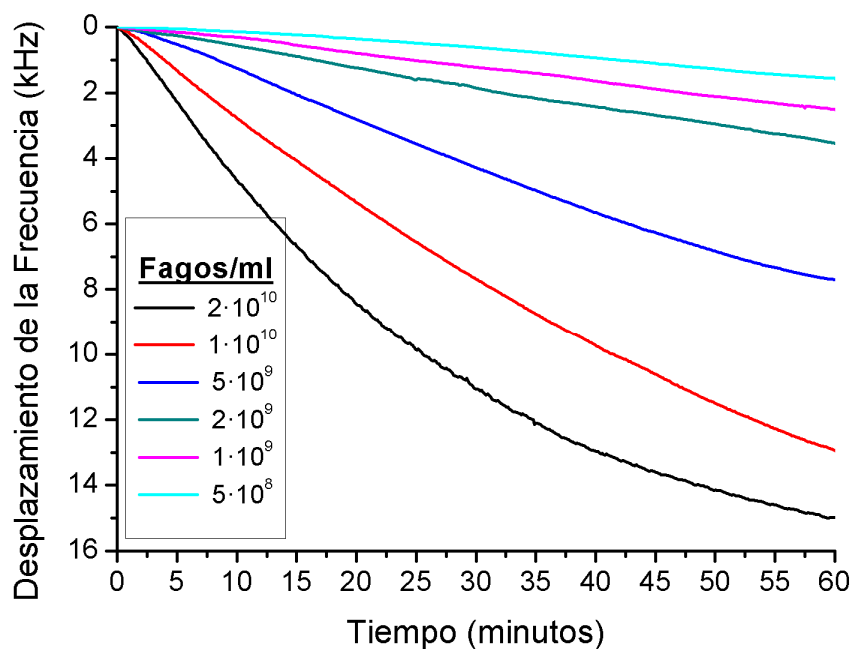


Figura 6.21. Detección en tiempo real de las diferentes concentraciones del fago M13 usando el anticuerpo AM13.

Para comprobar que el cambio de frecuencia se debe a la inmunorreacción como consecuencia de la alta afinidad entre el fago y el anticuerpo AM13, se han medido diferentes concentraciones en tiempo real con el anticuerpo GAM, sin afinidad específica con la proteína P8 (Fig. 6.22), para hacer un control de la medida.

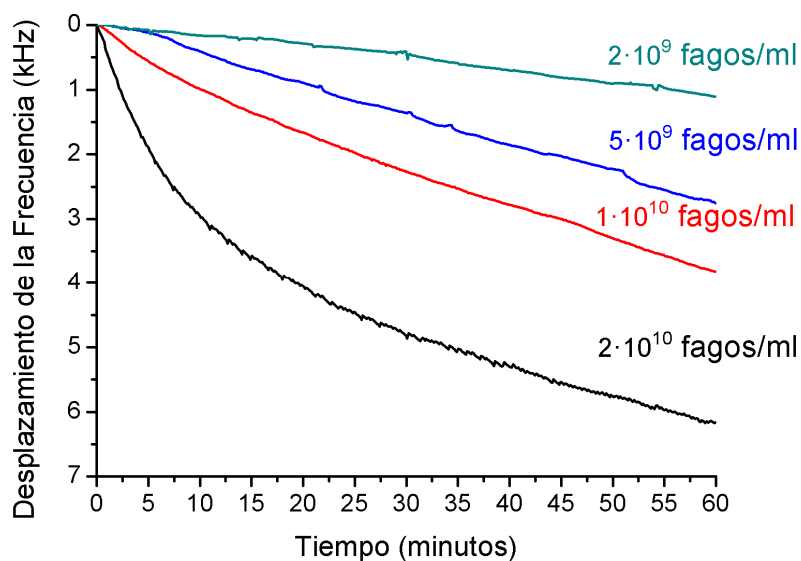


Figura 6.22. Medida del desplazamiento de la frecuencia en tiempo real debido a la detección del fago con el anticuerpo de control GAM.

El desplazamiento en frecuencia es notablemente inferior para la detección del M13 con el anticuerpo GAM (Fig. 6.23), y por tanto se puede asegurar que desplazamiento de frecuencia obtenido se debe a una alta afinidad entre el anticuerpo AM13 y el fago M13.

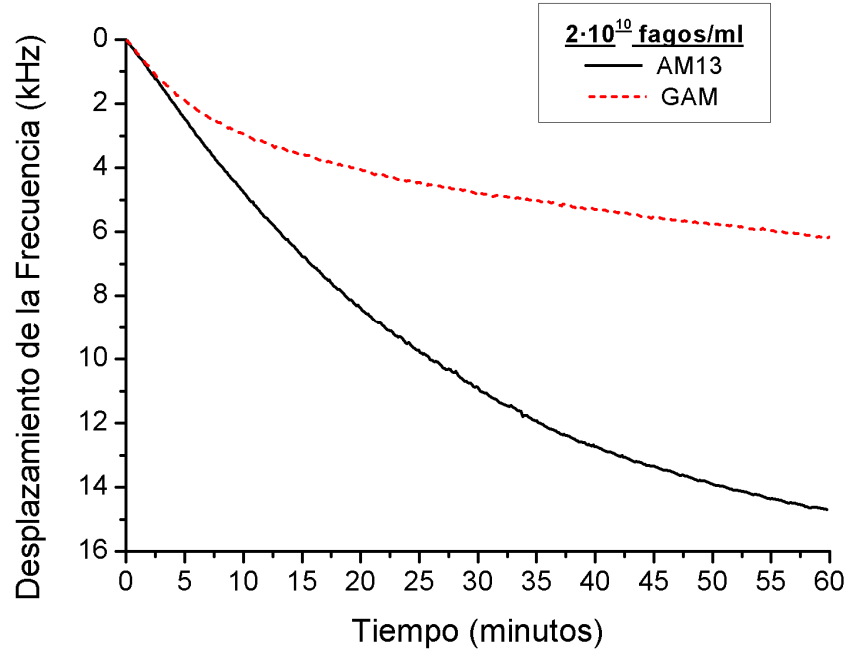


Figura 6.23. Medida del desplazamiento de la frecuencia en tiempo real debido a la detección mediante AM13 y control con GAM.

Una vez comprobada la correcta detección del fago mediante el anticuerpo AM13, se ha establecido una relación entre las concentraciones medidas y su desplazamiento en frecuencia, para ello se ha utilizado el modelo de Langmuir [3] (Fig. 6.24):

$$\Delta f = \Delta f_{max} \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (6-1)$$

donde Δf es el desplazamiento de la frecuencia, Δf_{max} el desplazamiento de la frecuencia para la saturación, K es la constante de Langmuir y c la concentración de fagos. De esta forma se ha obtenido un $\Delta f_{max} = (25 \pm 5)$ kHz y un $K = (10 \pm 3) \cdot 10^{-11}$ ml \cdot pfu $^{-1}$, permitiendo de esta forma una detección cuantitativa. Además, en todas las concentraciones medidas se ha producido un desplazamiento de frecuencia significativamente menor para la detección usando el anticuerpo GAM.

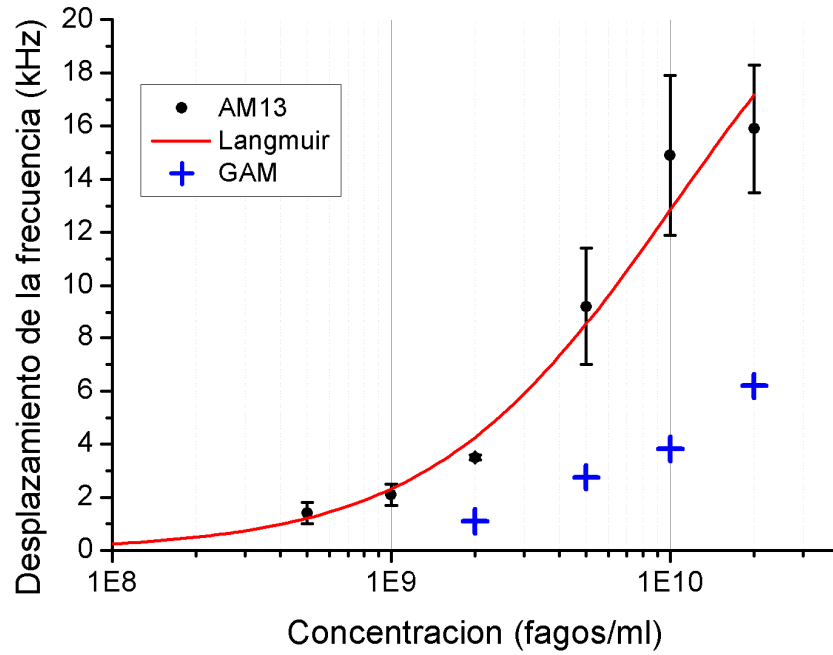


Figura 6.24. Desplazamiento de la frecuencia para la detección del fago, después de una hora, mediante el AM13 (y su ajuste a la ecuación de Langmuir), y control a través del anticuerpo GAM.

Se ha explicado con anterioridad que en el caso de flujo continuo es posible medir velocidades de variación de la frecuencia, mejorando el tiempo de respuesta. Por tanto para poder hacer una cuantificación, se ha realizado un ajuste de la velocidad tomada en los diez primeros usando el modelo de Langmuir:

$$\Delta v_f = \Delta v_{f_{max}} \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (6-2)$$

resultando $\Delta v_{f_{max}} = (1.1 \pm 0.2) \text{ kHz} \cdot \text{min}^{-1}$ y $K = (4 \pm 1) \cdot 10^{-11} \text{ ml} \cdot \text{pfu}^{-1}$ (Fig. 6.25).

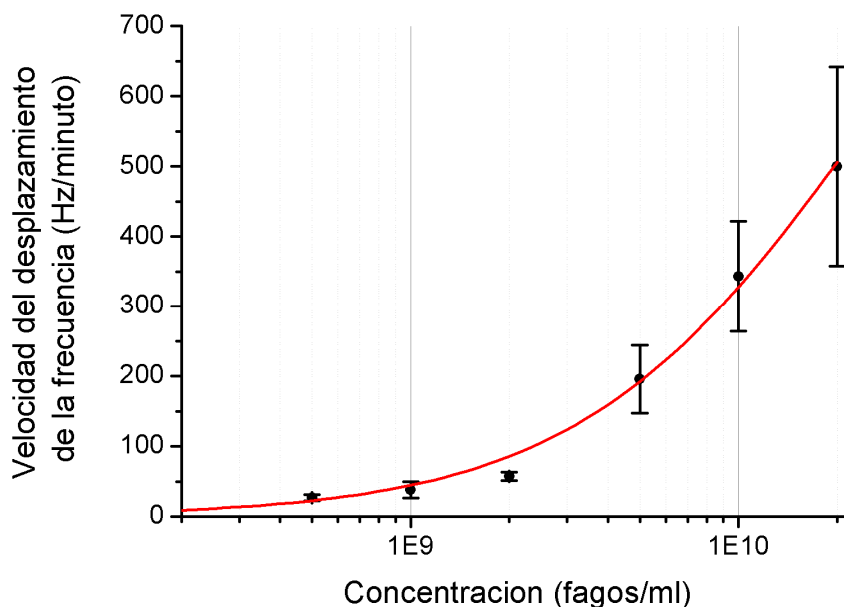


Figura 6.25. Medida de la velocidad durante los 10 primeros minutos de la detección del fago mediante el anticuerpo AM13 y su ajuste por Langmuir.

6.3.4.4. Detección del fago mediante el AM13 como anticuerpo secundario

Al igual que para el caso de la detección de inmunoglobulina de conejo (Rabbit-IgG), se ha utilizado el método de anticuerpo secundario para la detección del fago. En este caso, el anticuerpo AM13 es monoclonal, y por tanto la proteína P8 enlazada con un anticuerpo ya no podrá ser un blanco de nuevo para otro anticuerpo, ya que el epítipo está ocupado. Debido a que el fago lo componen 2800 proteínas P8 y solo unas pocas estarán enlazadas con anticuerpos, permaneciendo muchas proteínas P8 que pueden ser blanco para el anticuerpo AM13, por esta razón se ha utilizado como anticuerpo secundario para la detección indirecta. Este anticuerpo no se ha encontrado comercialmente disponible conjugado con nanopartículas, por eso se ha utilizado solo el anticuerpo. Aun con un anticuerpo sin conjugar, se puede observar un importante desplazamiento de la frecuencia en la detección indirecta (Fig. 6.26).

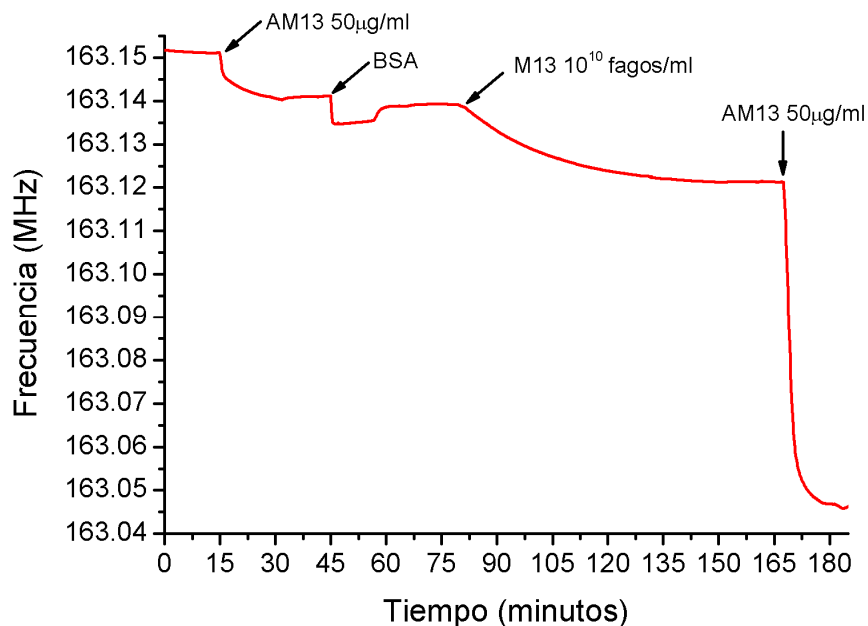


Figura 6.26. Respuesta de la frecuencia de resonancia para los siguientes pasos: i) 50 µg·ml⁻¹ del anticuerpo AM13, ii) BSA, iii) 10¹⁰ pfu·ml⁻¹ del M13 y iv) 50 µg·ml⁻¹ del anticuerpo AM13.

Este método de medida se ha usado para diferentes concentraciones (Fig. 6.27). La mínima concentración detectada ha sido 5·10⁷ pfu·ml⁻¹, con un desplazamiento de frecuencia de aproximadamente 1 kHz usando la detección con un anticuerpo secundario.

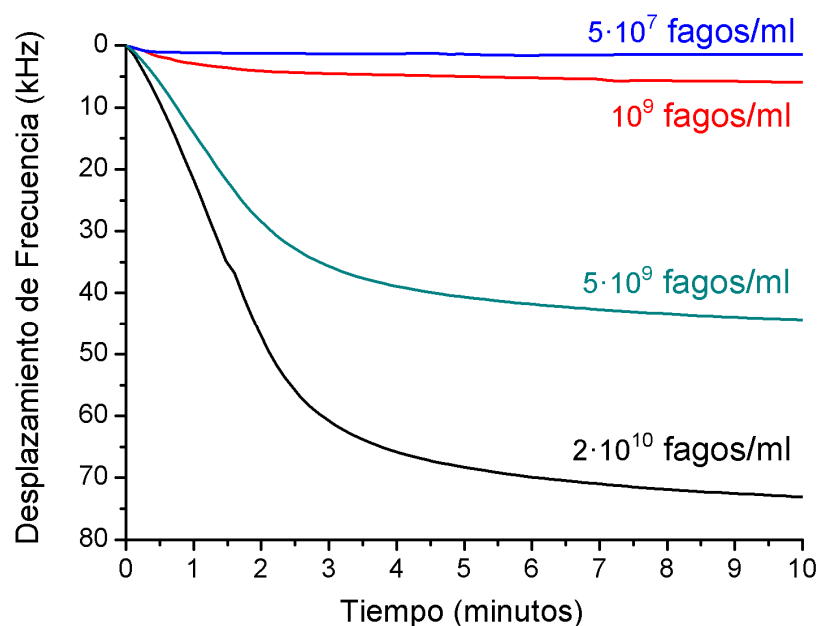


Figura 6.27. Detección del fago inmovilizado, mediante el AM13 como anticuerpo secundario.

6.3.4.5 Contabilización de los virus fijados a la superficie del sensor

La técnica DLA permite cuantificar los fagos incubando bacterias (apartado 6.3.4.1). Esta técnica se ha usado para conocer el número de fagos unidos a la superficie del sensor en el área limitada por el microcanal. El primer paso para asegurar una correcta cuantificación de los fagos es enjuagar con un 0.1% de TBS/Tween durante varios minutos y así eliminar todo el material biológico que no se ha unido a la superficie del sensor. El Tween 20 es un detergente no tóxico y esto permite realizar una limpieza sin destruir a los fagos. Una vez el sistema ha sido limpiado se cambian las jeringas y entonces se introduce en los conos una disolución 0.1M de TBS/trietilamina que debilita la unión entre los anticuerpos y los fagos, permitiendo que estos últimos queden libres y se transporten hasta las jeringas. Posteriormente se hace un enjuague con TBS hasta que se obtiene en las jeringas una muestra de 1 ml, la cual contiene los virus que anteriormente estaban en la superficie del sensor. Finalmente se contabilizan los virus que hay en este mililitro de muestra por la técnica DLA.

Pero además la sensibilidad de un dispositivo Love permite conocer la densidad de la masa superficial en el dispositivo, y por tanto posibilita cuantificar los virus fijados en la superficie del sensor mediante el desplazamiento de la frecuencia obtenido. A lo largo de este trabajo se ha estimado de diferentes maneras la sensibilidad. La diferencia entre sus valores posiblemente es consecuencia de que unos métodos son mas precisos que otros para el cálculo, pero el conjunto de resultados indica que la sensibilidad del dispositivo Love Cuarzo/SiO₂, está comprendida entre 20 m²·Kg⁻¹ y 40 m²·Kg⁻¹. Por tanto después de la detección de fagos a las de 10¹⁰ pfu·ml⁻¹ y 10⁹ pfu·ml⁻¹, los virus han sido cuantificados por la técnica de DLA y comparados con los estimados mediante la sensibilidad del dispositivo (Tabla 6.2)

Tabla 6.2. Cuantificación de los fagos unidos a la superficie del sensor después de la inmunorreacción para las concentraciones de 10^{10} pfu·ml⁻¹ y 10^9 pfu·ml⁻¹.

	Muestra 1	Muestra 2
Concentración de la muestra (pfu·ml ⁻¹)	10^{10}	10^9
Desplazamiento de la frecuencia de resonancia (kHz)	13	2
Fagos contados mediante la técnica DLA (pfu)	$3.5 \cdot 10^7$	$7.5 \cdot 10^6$
Números de fagos para una sensibilidad de $S_m^f = 20 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$	$3.5 \cdot 10^7$	$5.4 \cdot 10^6$
Números de fagos para una sensibilidad de $S_m^f = 40 \text{ m}^2 \cdot \text{Kg}^{-1}$	$7.0 \cdot 10^7$	$10.8 \cdot 10^6$

Los resultados han mostrado que el número de fagos contados mediante la técnica DLA está comprendido entre los estimados mediante las sensibilidades. Esto muestra que la estimación mediante la sensibilidad del dispositivo es bastante aproximada, y solo ha requerido una hora, a diferencia de la técnica DLA que necesita varias horas.

Por último se puede concluir que la muestra de 120 µl con concentración de 10^{10} pfu·ml⁻¹ contiene $1.2 \cdot 10^9$ fagos, y según las estimaciones realizadas para esta muestra, se han unido a la superficie entre un 3% y un 6% de los fagos. Para una concentración de 10^9 pfu·ml⁻¹ contiene $1.2 \cdot 10^8$ fagos y según las estimaciones se han fijado a la superficie entre un 4.5% y un 9% de los fagos. Esto era de esperar, ya que a lo largo del microcanal el flujo es laminar, lo que tiene como consecuencia que los fagos que se encuentren separados de la superficie del sensor no interaccionen con los anticuerpos, escapando de su campo de actuación.

6.4. Conclusiones

Dos diferentes inmunorreacciones se han llevado a cabo para validar el sistema de detección desarrollado para agentes de guerra biológica. Los antígenos detectados han sido un monómero de inmunoglobulina G de conejo, y el bacteriófago M13. Se ha ratificado que los sensores Love tienen una alta sensibilidad, lo que ha permitido detectar bajas concentraciones de bioagentes.

Debido a que el desplazamiento de los bioagentes en el modo estático solo se debe a la difusión, no promueve que se encuentren los anticuerpos con los antígenos. Sin embargo en el modo dinámico los antígenos son arrastrados por el medio líquido, lo que

favorece el encuentro entre anticuerpo y antígeno. Para utilizar pequeños volúmenes de muestra durante un largo periodo de tiempo se ha trabajado en modo dinámico usando microcanales, de 150 μm de altura.

Se ha demostrado la efectividad de utilizar un anticuerpo secundario para medir de forma indirecta un antígeno. Además, la utilización de anticuerpos conjugados con nanopartículas de oro, ha mostrado las siguientes ventajas: obtener grandes desplazamientos de frecuencia debido a la masa de las nanopartículas, y poder observar las inmunorreacciones mediante un microscopio electrónico de barrido.

Por último la técnica de doble capa de agar (DLA) se ha empleado para contar los bacteriófagos que han participado en la inmunorreacción llevada a cabo en la superficie del dispositivo. Para las concentraciones detectadas de 10^{10} pfu·ml⁻¹ y 10^9 pfu·ml⁻¹ se han comparado los fagos contados mediante DLA con los calculados con las sensibilidades estimadas del dispositivo, llegándose a obtener resultados similares.

6.5. Referencias

- [1] V. Raimbault, D. Rebière, C. Dejous, M. Guirardel, V. Conedera, Acoustic Love wave platform with PDMS microfluidic chip, *Sensors and Actuators A: Physical*, Volume 142, Issue 1, 10 March 2008, pp. 160-165.
- [2] Melzak, K. A., Martin, F., Newton, M. I., Mchale, G. and Gizeli, E. (2002), Acoustic determination of polymer molecular weights and rotation times. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.*, 40: 1490–1495.
- [3] M.J. Oliver, J. Hernando-García, P. Pobedinskas, K. Haenen, A. Ríos, J.L. Sánchez-Rojas, Reusable chromium-coated quartz crystal microbalance for immunosensing, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 88, Issue 1, 1 November 2011, pp. 191-195
- [4] Luiza N.H Arakaki, José G.P Espínola, Maria G da Fonseca, Severino F de Oliveira, Antonio N de Sousa, Tomaz Arakaki, Claudio Airoidi, Thioglycolic acid grafted onto silica gel and its properties in relation to extracting cations from ethanolic solution determined by calorimetric technique, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 273, Issue 1, 1 May 2004, pp. 211-217.

- [5] Hengyi Xu, Zoraida P. Aguilar, Lily Yang, Min Kuang, Hongwei Duan, Yonghua Xiong, Hua Wei, Andrew Wang, Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood, *Biomaterials*, Volume 32, Issue 36, December 2011, pp. 9758-9765.
- [6] Ivan H. El-Sayed, Xiaohua Huang, Mostafa A. El-Sayed, Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Cancer Letters*, Volume 239, Issue 1, 28 July 2006, pp. 129-135.
- [7] Lee Makowski, Terminating a macromolecular helix: Structural model for the minor proteins of bacteriophage M13, *Journal of Molecular Biology*, Volume 228, Issue 3, 5 December 1992, pp. 885-892.
- [8] Ollivier Tamarin, Corinne Déjous, Dominique Rebière, Jacques Pistré, Sylvie Comeau, Daniel Moynet, Jean Bezian, Study of acoustic Love wave devices for real time bacteriophage detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 91, Issues 1–3, 1 June 2003, pp. 275-284

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES DE LA INVESTIGACIÓN Y LÍNEAS FUTURAS

7.1. Conclusiones de la investigación

Los agentes de guerra química (CWA) y biológica (BWA) suponen una amenaza que exige la necesidad de sistemas preventivos que permitan detectarlos e identificarlos. Debido principalmente a la alta sensibilidad, a los cortos tiempos de respuesta y al bajo coste de los dispositivos basados en ondas acústicas superficiales (SAW), se ha propuesto su uso como sistemas de alarma para detectar agentes de guerra química (fase gaseosa) y biológica (fase líquida). Por tanto, con la consecución de los objetivos de este trabajo de investigación se han estudiado, diseñado y validado diferentes sistemas de detección basados en dispositivos SAW.

- **Dispositivos de ondas Rayleigh y dispositivos de ondas Love**

En una primera etapa, se ha realizado un estudio a partir de las soluciones de las ecuaciones que describen la propagación de cada tipo de onda acústica superficial (Rayleigh y Love) en sustratos piezoeléctricos. En el caso de la propagación de las ondas Love, la solución de la ecuación de dispersión se ha obtenido de forma numérica para encontrar la frecuencia síncrona y la sensibilidad en función del espesor de cada capa guía. Esto ha permitido conocer el espesor óptimo de las diferentes capas guías utilizadas, tanto del óxido de silicio (SiO_2) como del Novolac, para las cuales se obtiene su máxima sensibilidad. A partir de los resultados obtenidos se han depositado diferentes espesores de cada una de las capas guías, y se ha llevado a cabo un ajuste de la solución teórica a los datos experimentales, lo que ha permitido conocer el

módulo transversal, la densidad y la velocidad de propagación de las ondas horizontales transversales, para cada uno de los materiales de las capas guías utilizadas.

En el desarrollo de dispositivos de ondas Love con electrodo simple y capa guía de SiO_2 se ha observado la formación de escalones en la superficie de la capa guía, estos escalones provocan una reflexión de la onda propagada, conociéndose como el fenómeno de eco de triple tránsito (TTE), que llega a hacer inoperables a los dispositivos. A esta conclusión se ha llegado al eliminar los escalones mediante un proceso de pulido y ver que tal fenómeno desaparece. Finalmente en este trabajo se ha optado por desdoblar cada electrodo en dos, que es otra alternativa para eliminar el TTE, pero hay que resaltar que el proceso de pulido de la capa guía es un método de efectivo, aunque requiere un paso más en la fabricación del dispositivo.

Se ha demostrado, que en relación con la sensibilidad, los polímeros como Novolac son muchos más apropiados como capas guías que el SiO_2 , y esto se debe a que la velocidad de propagación de las ondas horizontales transversales en polímeros es mucho menor. El inconveniente de estos materiales es que atenúan de forma excesiva la onda propagada, y por tanto no permiten llegar al espesor para el cual los dispositivos alcanzan su mayor sensibilidad.

- **Array de sensores para la detección de agentes de guerra química**

Para la detección de agentes de guerra química se han preparado diferentes arrays de sensores SAW utilizando polímeros como capas sensibles. Una novedad en la elección de los polímeros más adecuados para detectar, discriminar y clasificar compuestos orgánicos volátiles, es realizar un estudio previo mediante la ecuación LSER. En este trabajo se ha realizado este estudio, para seleccionar seis polímeros que han permitido detectar, discriminar y clasificar los simulantes de agentes de guerra química seleccionados. Pero la realidad es que muy pocos polímeros y compuestos químicos tienen los parámetros de la ecuación LSER tabulados. Si existiese una amplia base de datos con los parámetros de los polímeros y compuestos orgánicos volátiles, se podrían obtener arrays mucho más eficaces.

Se han desarrollado diferentes arrays de sensores, variando el tipo de dispositivo SAW en el que están basados, los polímeros utilizados como capas sensibles y el método para depositarlos. Cada uno de estos arrays se ha testado con los diferentes simulantes de agentes de guerra química elegidos. Los sensores de los diferentes arrays han mostrado una alta sensibilidad para cada simulante de agente de guerra química, permitiendo detectar muy bajas concentraciones, por debajo del límite marcado por la dosis letal media (LC_{t50}). Además, los sensores han mostrado una buena correlación lineal entre el desplazamiento de frecuencia y la concentración del agente, lo que es muy importante para la calibración del array.

Una diferenciada respuesta de los sensores para los diferentes agentes de guerra química, que forman cada tipo de array, ha permitido que mediante un análisis de componentes principales, haya sido posible obtener los datos mas relevantes y discriminar cada compuesto. Con los resultados de las tres primeras componentes se han entrenado redes neuronales probabilísticas, y se ha conseguido en la mayor parte de los casos una correcta clasificación de cada simulante detectado.

- **Inmunosensores basados en dispositivos Love para la detección de bioagentes**

Los dispositivos Love basados en cuarzo/ SiO_2 se han empleado en el desarrollo de un sistema de detección de bioagentes en medio líquido, utilizando tecnología microfluídica. Para ello se ha diseñado y desarrollado un chip de PDMS que posibilita el uso de microcanales para trabajar en modo dinámico.

Dos diferentes inmunorreacciones se han llevado a cabo para caracterizar y validar el sistema de detección realizado. Se ha ratificado que los sensores Love tienen una alta sensibilidad frente a otros dispositivos referenciados en literatura, lo que permite detectar concentraciones de bioagentes más bajas.

El desplazamiento de los bioagentes en el modo estático solo se debe a la difusión y por tanto no se promueve el encuentro entre anticuerpo y antígeno. En cambio en, el modo dinámico, los antígenos son transportados por el medio líquido, favoreciendo el encuentro entre anticuerpo y antígeno. Operar en modo dinámico usando estructuras microfluídicas ha permitido utilizar pequeños

volúmenes de muestra durante un largo periodo de tiempo. Además, el uso de estos inmunosensores ha posibilitado conocer la concentración de antígeno en cada una de las muestras.

Se ha comprobado que anticuerpos con alta afinidad pueden ser utilizados como identificadores de bioagentes. Además, se ha propuesto como solución para detectar muy bajas concentraciones de antígeno, de forma indirecta, utilizar la inmunorreacción producida entre un anticuerpo secundario y el antígeno. Las ventajas de haber utilizado anticuerpos secundarios conjugados con nanopartículas de oro, han sido: obtener grandes desplazamientos de frecuencia debido a la masa de las nanopartículas, y poder observar las inmunorreacciones mediante un microscopio electrónico de barrido.

Por último la técnica de doble capa de agar se ha empleado para cuantificar bacteriófagos, que han participado en la inmunorreacción llevada a cabo en la superficie del dispositivo. Estos resultados se han comparado con los calculados mediante las sensibilidades estimadas del dispositivo, llegándose a obtener resultados similares.

7.2. Líneas futuras de la investigación

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se plantean diversas líneas de actuación y aplicaciones futuras:

- **Desarrollo de sensores**

A lo largo de esta investigación se ha comprobado que los polímeros, como Novolac, pueden aportar gran sensibilidad a los dispositivos, pero comprometen la amplitud de la onda para los espesores donde tienen su máxima sensibilidad. Por otro lado materiales como el SiO_2 , aportan menos sensibilidad pero se puede llegar a utilizar espesores mayores sin atenuar de forma excesiva la onda propagada. Ambos materiales tienen sus ventajas como capa guía, por esta razón sería interesante utilizar sensores cuya capa guía tenga una estructura multicapa, de tal forma que una primera capa guía de SiO_2 confine la energía de la onda propagada en el sustrato sin atenuar excesivamente dicha onda, y una segunda capa de Novolac confine gran parte de la energía de la onda propagada en SiO_2 . Como la capa que corresponde al Novolac será de menor espesor que cuando se

utilice por sí sola como capa guía, no se atenuará tanto la onda propagada. Por tanto sería muy interesante obtener la ecuación de dispersión para las ondas Love en el caso multicapa y encontrar mediante esta ecuación los espesores óptimos para cada uno de los materiales que forman la multicapa guía.

Las capas sensibles que se han utilizado en este trabajo son capas delgadas de polímero, en las que los volátiles son adsorbidos en la superficie y se han obtenido buenos resultados. Pero si se utilizaran materiales nanoestructurados, como nanofibras de polímeros, nanohilos, etc., se podría obtener una superficie mucho mayor para reaccionar con los compuestos volátiles, y de este modo obtener mejores respuestas.

- **Detección de agentes de guerra química**

Una finalidad de este trabajo es desarrollar sistemas que puedan ser utilizados por cualquier usuario y en cualquier lugar. Por esta razón el siguiente paso sería desarrollar, teniendo en cuenta los resultados presentados, un sistema SAW de detección portátil. Además también sería interesante para aplicaciones en seguridad que el sistema fuese inalámbrico ya que evitaría que el usuario del sistema se introdujese en un ambiente peligroso.

- **Detección de agentes de guerra biológica**

Para conseguir comercializar el sistema de detección de bioagentes presentado en esta investigación, sería importante aplicar un procedimiento automático mediante tecnología microfluídica, para funcionalizar la superficie del dispositivo y detectar el antígeno.

En inmunosensores puede ser muy interesante funcionalizar varias líneas de retardo con diferentes anticuerpos, para formar arrays que permitan una amplia identificación de bioagentes mediante métodos de patrones de reconocimiento.

Otro proyecto interesante sería incorporar microcolumnas de cromatografía de líquidos a la parte de microfluídica para poder separar componentes de una disolución y así caracterizarlos individualmente.

ANEXO 1

AGENTES DE GUERRA BIOLÓGICA

AGENTE	Bacillus anthracis (Bacteria)	Brucella (Bacteria)	Yersinia pestis (Bacteria)	Francisella tularensis (Bacteria)
DOSIS	8.000 a 50.000 esporas	10 a 100 organismos	100 a 500 organismos	10 a 50 organismos
Enfermedad	Ántrax o Carbunco	Brucelosis	Peste	Tularemia
Vía Infecciosa	Respiratoria Digestiva Cutánea	Respiratoria Digestiva Cutánea	Cutánea (pulgas de ratas infectadas o de persona a persona)	Respiratoria Digestiva Cutánea
Síntomas	Problemas graves de respiración y shock Dolor abdominal, vómito de sangre y diarrea Úlcera sin dolor	Similares a la gripe: fiebre, sudor, dolor de cabeza, dolores de espalda y debilidad física	Caracterizada por el bubón (tumor purulento y voluminoso) Hinchazón y dolor de los ganglios linfáticos palpables	Fiebre, rigidez y dolores generalizados. Ocasionalmente náuseas, vómitos y diarrea. Debilidad durante semanas o meses
Diagnóstico	Cultivos de esputo, líquido pleural, vómitos, heces y sangre ELISA* PCR**	Serología por aglutinación ELISA* Cultivo de sangre o médula ósea	Frotis y cultivos Test de anticuerpos fluorescentes Serología y título de anticuerpos	Serología
Prevención	Vacuna (BioThrax)	---	Vacuna	Vacuna
Tratamiento	Antibiótico	Antibiótico	Antibiótico	Antibiótico
Descontaminación	Bacteria: Sometiéndola a temperaturas de ebullición durante 30 minutos o desinfectantes como cloro Espora: A 140° grados durante horas	Altas temperaturas Luz solar Desinfectando con fenol o formaldehído	Altas temperaturas Luz solar Hipoclorito cálcico	Calor, 55°C durante 10 minutos o desinfectantes
Potencialidad	Alta letalidad, elevada persistencia, estabilidad Resistencia de las esporas (40 años) Dispersión en forma de aerosol	Baja dosis infectiva Elevada resistencia y persistencia a bajas temperaturas Dispersión en forma de aerosol	Alto contagio entre personas, elevada letalidad. Contaminación de aguas, harinas y granos húmedos Dispersión en forma de aerosol	Es una bacteria patógena muy infecciosa Persiste durante meses en ambientes húmedos Dispersión en forma de aerosol.

AGENTE	Clostridium botulinum (Bacteria)	Vibrio Cholerae (Bacteria)	Shigella (Bacteria)	Coxiella burnetti (Bacteria)
DOSIS	0.001 µg de toxina Tipo A	10-500 organismos	10 - 100 organismos	1-10 organismos
Enfermedad	Botulismo	Cólera	Shigelosis	Fiebre Q
Vía Infecciosa	Respiratoria Digestiva Cutánea	Digestiva	Digestiva	Respiratoria Cutánea
Síntomas	Visión doble, borrosa, dificultad para hablar y tragar, sensación de sequedad en la boca y debilidad muscular. Puede causar parálisis en los brazos, piernas, músculos principales y respiratorios	Diarrea, vómitos, dolor abdominal y entumecimiento de las piernas Debido a la pérdida de líquidos deshidratación y postración. En un 60% de los casos, muerte en pocas horas por colapso circulatorio y shock	Diarrea, fiebre y calambres estomacales En algunos casos dolores en las articulaciones y al orinar e irritación en los ojos (síndrome de Reiter) durante años.	Fiebre aguda, escalofríos, cefalalgia, debilidad, malestar general y sudoración profusa. En algunos casos neumonitis con tos, expectoración escasa, dolor torácico y signos físicos mínimos.
Diagnóstico	Exploraciones cerebrales, examen del líquido espinal, prueba de conducción de nervios y la prueba de tensilon para la miastenia gravis	Análisis clínicos de sangre y heces	Búsqueda de bacteria en las heces.	Serología IFA***
Prevención	Vacuna	Vacuna (cada 6 meses)	---	Vacuna (IND610)
Tratamiento	Antitoxina	Antibiótico	Antibiótico	Antibiótico
Descontaminación	La bacteria: hipoclorito y etanol. La toxina: inactiva por 0.1 N NaOH, destruida a temperatura de ebullición durante 10 minutos. La espora se destruye por calor húmedo a 120°C durante 15 minutos.	Calor seco, hervido, desinfectantes comunes, cloración o ionización del agua.	Desinfectantes como hipoclorito sódico (1%), etanol (70%), glutaraldehído (2%), etc. Calor húmedo 120°C 15 minutos. Calor seco 170°C 1 hora,	Hipoclorito sódico, etanol, glutaraldehído y formaldehído gaseoso. Calor a 130 °C durante 60 minutos. Radiación gamma.
Potencialidad	Alta letalidad, elevada persistencia de la toxina en agua y alimentos. Puede dispersarse mediante aerosol o por contaminación intencionada de los alimentos y el agua	Moderada o elevada tasa de letalidad Persistencia del organismo Capacidad de dispersión por sabotaje del agua y los alimentos Dispersión en forma de aerosol	Capacidad de dispersión a través de agua y alimentos contaminados intencionadamente	Infecta durante meses o años. Alta persistencia. Dispersión en forma de aerosol.

AGENTE	Smallpox (Virus)	Virus de la EEV (Virus)	Virus WEEV (Virus)	Filovirus, Arenavirus, Bunyavirus y los Flavivirus (Virus)
DOSIS	10 a 100 organismos	1 a 10 organismos	1 a 10 organismos	1 a 10 organismos
Enfermedad	Viruela	Encefalitis equina venezolana	Encefalitis equina del oeste	Fiebres hemorrágicas virales
Vía Infecciosa	Respiratoria Cutánea (de persona a persona)	Cutánea (Picadura de mosquitos)	Cutánea (Picadura de mosquitos)	Cutánea Digestiva (Animal, garrapata, mosquito o de persona a persona)
Síntomas	Erupción maculopopular en boca, faringe, cara, brazos, tronco y piernas, posteriormente se convierten en vesículas y pústulas, y finalmente en costras que al caerse dejan grandes marcas.	Afecta al sistema nervioso central: malestar generalizado, fiebre, dolor de cabeza, fotofobia y mialgias en las piernas y el área sacro-lumbar. Continúa con náuseas, vómitos, tos, garganta dolorida, y diarrea. Período prolongado de astenia y letargo.	Síntomas similares a una gripe leve, fiebre, dolor de cabeza, malestar general, mialgias y nauseas.	Fiebre, fatiga, mareos, dolor muscular, cansancio. Los casos severos: hemorragia bajo la piel, en órganos internos o en orificios del cuerpo, shock, convulsiones, fallo del sistema nervioso, coma y delirio. Insuficiencia de los riñones.
Diagnóstico	Aislar el virus con pruebas in vitro	Recuento de células blancas en sangre. ELISA* Cultivos celulares con suero o especímenes de la garganta.	Aislamiento del virus o por pruebas serológicas típicas.	ELISA* PCR**
Prevención	Vacuna (no es inocua)	Vacuna (TC-83 y TC-84)	---	Existe vacuna para fiebre amarilla y fiebre hemorrágica argentina
Tratamiento	No hay tratamiento	---	Terapia de sostén	Tratamiento de apoyo
Descontaminación	Cloroformo, hipoclorito o amonio cuaternario	Desinfectantes comunes. Calor seco.	Calor a 45°C durante 15-30 minutos. Desinfección con formaldehído (0.1%), glutaraldehído o fenol (0.5%).	Los virus son eliminados con desinfectantes comunes. Calor seco a 56°C durante 30 minutos. Luz ultravioleta.
Potencialidad	Alta transmisión de persona a persona, letalidad, infectividad, dispersión en el aire (aerosol) La viruela negra o hemorrágica tiene alta letalidad	Rápida actuación (entre 1 y 5 días) Capacidad de dispersión por aerosol	Alta tasa de letalidad Altamente infectivo. No existe vacuna	Alta tasa de letalidad y de infectividad. Rápida frecuencia de actuación. Capacidad de transmitirse de persona a persona. Dispersión en forma de aerosol

AGENTE	Rickettsia Prowazekii (Parásito intracelular)	Alfatoxina (Micotoxina)	Enterotoxina B (Toxina)	T2 (Micotoxina)
DOSIS	---	---	---	---
Enfermedad	Tifus epidémico	---	---	Micotoxicosis
Vía Infecciosa	Cutánea (Picaduras de piojos)	Respiratoria Digestiva Cutánea	Respiratoria Digestiva	Respiratoria Digestiva Cutánea
Síntomas	Fiebre alta, escalofríos y mialgias, cefalea y malestar intenso. Después aparece erupción maculopapular en el tronco y extremidades. Delirio o coma. Finalmente puede darse insuficiencias renales o de miocardio.	Molestias abdominales, fiebre, vómitos, anorexia, ictericia, enema en las extremidades inferiores, hígado palpable y en los casos más graves se producen hemorragias gastrointestinales.	Fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mialgias, tos y dolor torácico. También puede producir náuseas, vómitos y diarreas. En el caso de altas exposiciones pueden provocar shock séptico e incluso a la muerte.	Pérdida de peso, vómitos, inflamación de la piel, diarrea sanguinolenta, hemorragia difusa y posiblemente muerte. Por exposición aguda: shock circulatorio caracterizado por un débito cardíaco reducido, hipotensión arterial, acidosis láctica y muerte en 12 horas.
Diagnóstico	Serología por aglutinación ELISA*	---	---	En orina y sangre mediante cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta afinidad.
Prevención	Vacuna que disminuye la mortalidad (cada 4 meses)	Inductores de algunos Citocromos P450, como el Indol-3-carbinol, para proporcionar protección.	---	---
Tratamiento	Antibiótico	Terapia de soporte	Tratamiento de soporte	Suministro de líquidos intravenosos y medicamentos para tratar la inflamación
Descontaminación	Calor a 45°C durante 15-30 min Descontaminación con formaldehído (0.1%), glutaraldehído o fenol (0.5%).	Son inactivadas por una amplia gama de reactivos (amonio concentrado y bisulfito de sodio)	Jabón y agua o hipoclorito al 0.5% durante 10-15 minutos	Agua y jabón
Potencialidad	Alta tasa de letalidad. No existe vacuna.	Produce una incapacitación de forma rápida. No existe vacuna ni tratamiento específico. Puede ser dispersada en forma de aerosol.	Gran estabilidad en el medio. Contaminación de alimentos y agua de forma intencionada. Dispersión en forma de aerosol. Incapacita al 80% del personal en el área de ataque (entre 1 y 6 horas).	Alta tasa de letalidad, Persistencia durante años. Dispersión en forma de aerosol. Contaminación intencionadamente de agua y comida. No existe vacuna.

AGENTE	Saxitoxina (Neurotoxina)	Ricina (Toxina)
DOSIS	Mortal ~10 mg (Ingestión)	DL50 ~40 mg·min/m ³ (Inhalación) Mortal con ~1 mg (Inoculación)
Enfermedad	---	---
Vía Infecciosa	Respiratoria Digestiva	Respiratoria Digestiva Cutánea
Síntomas	Sensación de cosquilleo y adormecimiento de la boca, región peribucal, encías y lengua, irradiándose luego a cuello y hombros. En casos moderados y severos: cefalea, mareos, náuseas, insensibilidad de brazos, piernas y cuello, dificultad para hablar y tragar, rigidez e incoordinación de extremidades, sensación de flotación, dificultad respiratoria y taquicardia. En caso de ser ingerida: parálisis de los músculos de las piernas y brazos y finalmente a la muerte por parálisis respiratoria.	Inhalación: tos, presión en el pecho, dificultad para respirar, náusea y dolor en los músculos, produciendo fallo en los sistemas circulatorio y respiratorio que puede producir la muerte entre 36 a 48 horas. Contacto: depende del solvente añadido y del tiempo de contacto. Inoculación: muerte instantánea por fallo de los órganos vitales.
Diagnóstico	ELISA* Inoculación biológica en ratones	Identificación de ricina en secreciones, suero y tejidos mediante ELISA
Prevención	---	---
Tratamiento	---	---
Descontaminación	Álcalinos fuertes	Lejía diluida o jabón y agua.
Potencialidad	Rapidez con la que aparecen los primeros síntomas (5-20 minutos), que provocan incapacidad en poco tiempo (2 horas).	Toxina muy potente Alta letalidad Gran persistencia en el medio Dispersión por aerosol

ANEXO 2

CONSTANTES CARACTERÍSTICAS DEL CUARZO

- Densidad: $2650 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$
- Constantes de rigidez c_{ij} :

$$[c] = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} & c_{14} & 0 & 0 \\ c_{12} & c_{11} & c_{13} & -c_{14} & 0 & 0 \\ c_{13} & c_{13} & c_{33} & 0 & 0 & 0 \\ c_{14} & -c_{14} & 0 & c_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{44} & c_{14} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c_{14} & \frac{c_{11}-c_{12}}{2} \end{bmatrix}$$

con: $c_{11}=0.867 \cdot 10^{11} \text{ (N}\cdot\text{m}^{-2})$ $c_{14}=-0.179 \cdot 10^{11} \text{ (N}\cdot\text{m}^{-2})$
 $c_{12}=0.070 \cdot 10^{11} \text{ (N}\cdot\text{m}^{-2})$ $c_{33}=1.070 \cdot 10^{11} \text{ (N}\cdot\text{m}^{-2})$
 $c_{13}=0.119 \cdot 10^{11} \text{ (N}\cdot\text{m}^{-2})$ $c_{44}=0.579 \cdot 10^{11} \text{ (N}\cdot\text{m}^{-2})$

- Constantes dieléctricas ϵ_{ij} :

$$[\epsilon_{ij}] = \begin{bmatrix} \epsilon_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \epsilon_{11} & 0 \\ 0 & 0 & \epsilon_{33} \end{bmatrix}$$

con: $\epsilon_{11}=3.92 \cdot 10^{-11} \text{ (F}\cdot\text{m}^{-1})$ $\epsilon_{33}=4.10 \cdot 10^{-11} \text{ (F}\cdot\text{m}^{-1})$

- Constantes piezoeléctricas e_{ij} :

$$[e_{ij}] = \begin{bmatrix} e_{11} & -e_{11} & 0 & e_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -e_{14} & -e_{11} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

con: $e_{11}=0.1710 \text{ (C}\cdot\text{m}^{-2})$ $e_{14}=0.0406 \text{ (C}\cdot\text{m}^{-2})$

PUBLICACIONES

Publicaciones en revistas (SCI)

1. D. Matatagui, J. Martí, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Chemical warfare agents simulants detection with an optimized SAW sensor array, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 154, Issue 2, 20 June 2011, Pages 199-205.
2. D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. Aleixandre, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Array of Love-wave sensors based on quartz/Novolac to detect CWA simulants, *Talanta*, Volume 85, Issue 3, 15 September 2011, Pages 1442-1447.
3. M.C. Horrillo, J. Martí, D. Matatagui, J.P. Santos, I. Sayago, J. Gutiérrez, I. Martin-Fernandez, P. Ivanov, I. Gràcia, C. Cané, Single-walled carbon nanotube microsensors for nerve agent simulant detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 157, Issue 1, 20 September 2011, Pages 253-259.
4. D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Love-wave sensor array to detect, discriminate and classify chemical warfare agent simulants, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Available online 27 February 2012, In Press.

Publicaciones en revistas (no SCI)

1. D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Narices electrónicas para la detección de agentes de guerra química, *Percepnet*, pendiente de publicación.

Publicaciones en congresos internacionales

1. D. Matatagui, J. Martí, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Optimized design of a SAW sensor array for chemical

- warfare agents simulants detection, *Procedia Chemistry*, Volume 1, Issue 1, September 2009, Pages 232-235, (Publicación ISI).
2. D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. Aleixandre, J.P. Santos, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Love-wave sensor array based on Quartz/Novolac to detect CWA simulants, 1st Spain - Hong Kong Bilateral Workshop on Micro and Nanosystems, Octubre 2010.
 3. D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. Aleixandre, J.P. Santos, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Low-wave sensor to detect low-levels of CWA simulants, 5as Jornadas Franco-españolas, Noviembre 2010.
 4. D. Matatagui, J. Fontecha, M. J. Fernández, I. Gràcia, C. Cané, and M. C. Horrillo, Array of Love-wave sensors to detect CWA low-levels, *AIP Conf. Proc.* 1362, 2011, pp. 277-278, (Publicación ISI).
 5. D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Discrimination and classification of chemical warfare agent simulants using a Love-wave sensor array, *Procedia Engineering*, Volume 25, 2011, Pages 23-26, (Publicación ISI).
 6. D. Matatagui, D. Moynet, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Esquivel, I. Gràcia, C. Cané, C. Déjous, D. Rebière, J.P. Santos, M.C. Horrillo, Development of a Love-wave Immunosensor with Microfluidic Technology to Detect Phages in Dynamic Mode. Pendiente de publicación proceeding IMCS-2012.
 7. D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. J. Oliver, J. Hernando-García, J. L. Sánchez-Rojas, I. Gràcia, C. Cané, J.P. Santos, M.C. Horrillo, Comparative evaluation between two acoustic immunosensors: Love-wave and QCM, and systems of measurement: dynamic and static. Abstract aceptado en Eurosensors-2012.

Publicaciones en congresos nacionales

1. J. Martí, D. Matatagui, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, M. Aleixandre, F.J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Saw sensor array for chemical warfare agent simulants, *Proceedings of the 2009 Spanish Conference on Electron Devices*, CDE'09, 2009, 978-1-4244-2839-7/09/\$25.00 (C)2009 IEEE, Pages 305-308 (Publicación ISI).

2. D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, M. Aleixandre, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Nariz electrónica optimizada para detectar simulantes de agentes de guerra química, III Jornadas olfativas, Mayo 2010.
3. D. Matatagui, J. Fontecha, M.J. Fernández, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Design and fabrication of Love-wave sensors: An experimental study, IEEExplore 8th Spanish Conference on Electron Devices, CDE 2011, 2011, 978-1-4244-7865-1/11/\$26.00 ©2011 IEEE, Pages 1-4 (Publicación ISI).
4. D. Matatagui, M.J. Fernández, J. Fontecha, J.P. Santos, I. Gràcia, C. Cané, M.C. Horrillo, Discrimination and classification of chemical warfare agent simulants using an e-nose based on love-wave sensors, IV Jornadas olfativas, Mayo 2012.